

Trabajo de Tesis Doctoral – Año 2015

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

**Caracterización funcional de factores de transcripción
de tipo NF-Y y GRAS en la asociación simbiótica
Phaseolus vulgaris - *Rhizobium etli***

Lic. Carolina Rípodas



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**



**Dirección
Dr. María Eugenia Zanetti
Dr. Flavio Antonio Blanco**



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

**“Caracterización funcional de factores de
transcripción de tipo NF-Y y GRAS en la
asociación simbiótica
Phaseolus vulgaris - *Rhizobium etli*”**

Lic. Carolina Rípodas

Director: Dr. María Eugenia Zanetti
Co director: Dr. Flavio Antonio Blanco



Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
UNLP - CONICET
Año 2015

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, bajo la dirección de la Dr. María Eugenia Zanetti y la co-dirección del Dr. Flavio Antonio Blanco.

Agradecimientos

A la Dra. María Eugenia Zanetti y al Dr. Flavio Blanco por la dirección y co-dirección del presente trabajo, por la formación profesional y humana. Euge y Flavio, no alcanzan las palabras para agradecerles el estímulo, la confianza y el cariño que me brindaron a lo largo de estos años.

Al Dr. Antonio Lagares y al Dr. Mario Aguilar, al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), la Facultad de Ciencias Exactas y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por brindarme el espacio físico, equipos e instalaciones necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y CONICET por el otorgamiento de becas que posibilitaron la realización de la tesis.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, presentes y que han pasado por R4: Joaco, Meli, Marcos, Karen, Prisci, Vir, Mauri, Efren, Sole, Clau, Ana, Vir S, Juli y Santi por su amistad, apoyo y contribución a este trabajo.

Al Dr. Andreas Niebel, *Laboratoire des interactions plantes microorganismes INRA CNRS, Toulouse-France*, por la posibilidad de realizar dos pasantías de trabajo en su laboratorio y por brindar material para esta tesis. Al Dr. Mael Baudin por la ayuda brindada durante las pasantías realizadas en Toulouse y su amistad.

A los CPAs del Instituto, especialmente a Claudio, Paula y Silvana por sus aportes al trabajo de investigación y en el trabajo diario dentro del laboratorio.

A todos los investigadores y becarios del IBBM. Un especial agradecimiento a Los Ángeles por las lindas tardes y competencias de fútbol compartidas.

A mi mamá Laura y papá Adolfo, mis grandes referentes. Por su inmenso cariño, contención y apoyo.

A mis abuelas Baba e Ita que me acompañan cada día.

A Seba, por su incondicional compañía y amor. Por bancarme y seguirme en todas. A su familia.

A mi hermana Ana y mi cuñado Anto, por estar siempre que los necesité. A mis tíos y primos. A mi abuela postiza Gordita, mi padrino Cheche, Lidia, Ana María y Graciela, por su continuo interés y apoyo. A la familia Lagares.

A mis queridos amigos: Meninas y POs, dolorenses, resto de la facu y amigo que me dio la ciencia, por tantos años de amistad y momentos compartidos.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis se comunicaron a través de los siguientes artículos:

A phylogenetically conserved group of NF-Y transcription factors interact to control nodulation in legumes.

Maël Baudin, Tom Laloum, Agnès Lepage, Carolina Rípodas, Federico Ariel, Lisa Frances, Martin Crespi, Pascal Gamas, Flavio Blanco, Maria Eugenia Zanetti, Fernanda de Carvalho-Niebel and Andreas Niebel (2015) Recientemente aceptado en Plant Physiology. doi: 10.1104/pp.15.01144

Annotation, Phylogeny and Expression Analysis of the Nuclear Factor Y Gene Families in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*).

Carolina Rípodas, Mélissee Castaingts, Joaquín Clúa, Flavio Antonio Blanco and Maria Eugenia Zanetti (2015) Frontiers in Plant Science. **5**. doi: 10.3389/fpls.2014.00761

Transcriptional regulators of legume-rhizobia symbiosis: nuclear factors Ys and GRAS are two for tango.

Carolina Rípodas, Joaquín Clúa, Marina Battaglia, Maël Baudin, Andreas Niebel, María Eugenia Zanetti, Flavio Antonio Blanco. Plant Signaling and Behaviour, 2014;9:e28847. doi:10.4161/psb.28847

The NF-YC1 interacting protein SIN1, a member of the GRAS family, is required for nodule organogenesis, infection thread progression and lateral root growth.

Marina Battaglia*, Carolina Rípodas*, Joaquín Clúa, Maël Baudin, Mario O. Aguilar, Andreas Niebel, María Eugenia Zanetti, Flavio Antonio Blanco. Plant Physiology, 2014 Mar;164(3):1430-42. doi: 10.1104/pp.113.230896.

*Ambos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo

Common bean as an emerging model grain legume

Virginia Dalla Via, Carolina Rípodas, Joaquín Clúa, Candela Narduzzi, Mauricio Reynoso, Mario Aguilar, María Eugenia Zanetti and Flavio Blanco. Nova Publishing, NY, USA. ISBN 978-1-62808-280-7.

Índice general

Resumen	1
Introducción	3
Hipótesis y Objetivos	32
Capítulo I - Resultados y Discusión	36
Capítulo II - Resultados y Discusión	66
Capítulo III - Resultados y Discusión	100
Conclusiones y Perspectivas	126
Materiales y Métodos.....	128
Material suplementario	156
Bibliografía	168

Índice temático

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1. Importancia del nitrógeno en la producción vegetal	4
2. Fijación biológica de nitrógeno	6
3. Importancia mundial de las leguminosas	7
4. <i>Phaseolus vulgaris</i>	9
5. Asociación simbiótica fijadora de nitrógeno entre rizobios y leguminosas	12
5.1. Infección y organogénesis del nódulo	12
5.2. Bases moleculares de la nodulación	17
6. Asociación simbiótica entre <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Rhizobium etli</i>	21
7. Factores de transcripción NF-Y y su rol en la nodulación	22
8. Factores de transcripción GRAS	28
8.1. Identificación de un factor de transcripción tipo GRAS de poroto	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
Objetivo general e hipótesis de trabajo	33
Objetivos específicos.....	34
CAPÍTULO I. Caracterización de los factores heterotriméricos NF-Y de	
<i>Phaseolus vulgaris</i> durante su asociación con <i>Rhizobium etli</i>.....	36
1. Identificación, anotación y análisis de los NF-Ys de <i>P. vulgaris</i>	36
1.1 Estructura génica de los PvNF-Ys.....	40
1.2 Identificación de uORFs en los PvNF-YAs	42
2. Alineamientos múltiples y análisis filogenético de las familias PvNF-Y	43
3. Análisis de la expresión de genes <i>PvNF-Ys</i> en diferentes órganos y durante la asociación simbiótica con <i>R. etli</i>	54
CAPÍTULO I - Discusión	61

CAPÍTULO II – Caracterización funcional de PvNF-YA1 en la asociación simbiótica entre <i>P. vulgaris</i> y <i>R. etli</i>.....	66
1. Análisis de la secuencia de PvNF-YA1	67
2. Localización subcelular y perfil de expresión de PvNF-YA1	69
3. Interacción de PvNF-YA1 con otras subunidades del factor de transcripción NF-Y	73
4. Generación de plantas con niveles aumentados de PvNF-YA1	76
5. Análisis del efecto de la sobreexpresión de PvNF-YA1 sobre la arquitectura de raíz y la simbiosis	78
6. Obtención de plantas compuestas con niveles reducidos de <i>PvNF-YA1/A9</i>	84
7. Evaluación del efecto del silenciamiento de <i>PvNF-YA1/A9</i> sobre la arquitectura de raíz, la organogénesis del nódulo y la infección por <i>R. etli</i>	87
8. Efecto del silenciamiento de <i>PvNF-YA1/A9</i> sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular	91
CAPÍTULO II - Discusión	93
PvNF-YA1 y PvNF-YA9 participan en la infección bacteriana y en la organogénesis del nódulo	93
PvNF-YA1 forma un complejo estable con PvNF-YC1	95
PvNF-YA1 participa en la especificidad de cepa.....	96
CAPÍTULO III – Caracterización fenotípica de SIN1, una proteína tipo GRAS que interactúa con PvNF-YC1	100
1. Confirmación de la interacción entre SIN1 y PvNF-YC1	100
2. Localización subcelular de SIN1	106
3. Perfil de expresión de <i>SIN1</i> en diferentes órganos de <i>P. vulgaris</i> y a tiempos tempranos de la interacción con <i>R. etli</i>	107
4. Generación de plantas compuestas con niveles reducidos en <i>SIN1</i>	111
5. Efecto del silenciamiento de <i>SIN1</i> en la arquitectura de la raíz	112
6. Evaluación del efecto del silenciamiento de <i>SIN1</i> en los eventos tempranos de la nodulación y la formación de nódulos	115
7. Efecto del silenciamiento de SIN1 sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular	118
Capítulo III - Discusión	121
SIN1 es requerido para el desarrollo de las raíces laterales.....	121
SIN1 forma un complejo estable con PvNF-YC1 <i>in planta</i>	122
SIN1 participa en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre <i>P. vulgaris</i> y <i>R. etli</i>	123
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	126
MATERIALES Y MÉTODOS	128
1. Medios de Cultivo y Soluciones.....	129
1.1. Medios de cultivo	129
1.2. Soluciones empleadas	130
2. Material biológico	132
2.1. Semillas	132
2.2. Cepas bacterianas.....	132
Generación de células de <i>E. coli</i> DH5α competentes químicas.....	133
Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes	134
Generación de células electrocompetentes de <i>A. rhizogenes</i> K599 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101/03.....	134

Transformación de células de <i>Agrobacterium</i> electrocompetentes.....	135
3. Manipulación de ácidos nucleicos	135
3.1. Minipreparación de DNA plasmídico	135
3.2. Preparación de cDNA.....	136
3.3. Reacciones de PCR	137
3.4. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa	137
3.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	138
4. Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY.....	139
5. Condiciones de cultivo, transformación de plantas de <i>P. vulgaris</i> e inoculación con <i>R. etli</i>	141
6. Análisis de la expresión del transgen y las fusiones a GFP mediante Western blot	144
7. Caracterización fenotípica de las plantas compuestas	146
7.1. Cinéticas de nodulación	146
7.2. Determinación de peso seco	146
7.3. Medida de la longitud de raíces y densidad de raíces laterales.....	146
7.4. Determinación del tamaño de los nódulos	147
7.5. Cosecha de distintos órganos de plantas de poroto	147
7.6. Ensayos de coinoculación y análisis de polimorfismo del gen <i>nodC</i>	147
8. Ensayos de localización subcelular y complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC).....	149
9. Ensayos de actividad β -glucuronidasa	149
10. Observaciones macroscópicas y microscópicas	150
11. Ensayos de co-inmunoprecipitación.....	151
12. Ensayo de doble híbrido por retransformación de levadura.....	152
13. Actividad β -galactosidasa.....	153
14. Análisis bioinformáticos	154
MATERIAL SUPLEMENTARIO	156
BIBLIOGRAFÍA	168

Abreviaturas

Ade (A): adenina
AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphism
BiFC: bimolecular fluorescence complementation
cDNA: ácido desoxirribonucleico copia
CoIP: co-inmunoprecipitación
DNA: ácido desoxirribonucleico
DPI: días post-inoculación
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
eEF1 α : eukaryotic elongation factor 1 α
ENODs: Early Nodulin
ERN: Ethylene Response Factor Required for Nodulation
EST: expressed sequences tags
FAO: Food and Agricultural organization
FBN: fijación biológica de nitrógeno
FLAG: péptido DYKDDDDK
GFP: Green Fluorescence Protein
GRAS: Giberellic acid-Insensitive (GAI), Repressor of GAI (RGA) and Scarecrow(SCR)
GUS: β -glucuronidasa
hs: hora
HF: epitope dual His-FLAG
HFD: histone fold like domain
His (H): histidina y epitope de histidinas
HPI: horas post-inoculación
HRP: horseradish peroxidase
IT: hilo de infección
Kb: kilopares de bases
kDa: kilo Daltons
LB: medio de cultivo Luri
Leu (L): Leucina
LRR: leucine rich repeat
LysM: lysin motif
mg: miligramo
miRNA: micro RNA
min: minutos
MOPS: ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfónico ácido 4-(N-Morfolino)propanosulfónico
mRNA: RNA mensajero
MM: marcador de peso molecular
NF: Nod factor
NF-Y: nuclear factor Y
NIN: nodule inception
NLS: nuclear localization signal
NSP: Nodulation Signaling Pathway
ocs: octopina sintasa
OD_{xxx}: Densidad Óptica medida con una longitud de onda de xxx nm
ORF: open reading frame
pCaMV 35S: promotor del gen 35S del virus del mosaico del coliflor
pI: punto isoeléctrico
Pb: pares de bases
PBS-T: buffer fosfato salino con Tween 20%
PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PTGS: post transcripcional gene silencing
qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RLK: receptor like kinase
RNA: ácido ribonucleico
RNAi: RNA de interferencia
RNAseq: secuenciación masiva de RNA
rpm: revoluciones por minuto
RT- qPCR: Real Time - reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT: transcripción reversa
SD: desviación estándar
SDS: dodecil sulfato de sodio
SEM: error estándar de la media
Seg: segundos
SIN1: Scarecrow like-13 involved in nodulation
TBE: TRIS buffer EDTA
TBS: TRIS buffer salino
TEMED: N`-N`-N`-N` tetrametiletilenediamina
Tm: temperatura de melting
Tnos: terminador de la nopalina sintasa
Trp (W): triptofano
T35S: terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor
uORF: marco abierto de lectura previo al ORF principal
UTR: untranslated region
UV: luz ultravioleta
WB: western blot
xg: veces de gravedad
YFP: yellow fluorescence protein

Resumen

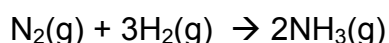
La fijación biológica de nitrógeno que surge a partir de la relación simbiótica entre rizobios y leguminosas permite la incorporación de nitrógeno al suelo para su explotación en sistemas agropecuarios a muy bajo costo. En esta relación compleja y específica existen determinantes moleculares de las plantas que gobiernan la colonización preferencial por ciertas cepas de rizobios. Las plantas integran señales derivadas del microsimbionte y del ambiente para iniciar los programas de organogénesis de estructuras diferenciadas llamadas nódulos y el proceso de infección. Varios factores de transcripción desempeñan funciones fundamentales en estos procesos, incluyendo las proteínas de las familias GRAS y NF-Y. En el presente trabajo de tesis se generó un conjunto de datos de secuencias, estructuras génicas, relaciones filogenéticas y patrones de expresión de genes que codifican las subunidades NF-Y en *Phaseolus vulgaris*, la leguminosa de grano más importante utilizado para el consumo humano directo. A partir de este análisis se seleccionaron genes candidatos para estudiar su rol en la nodulación mediante genética reversa. La reducción de los niveles de mRNA de *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* condujo a la ausencia de nodulación y provocó defectos en el proceso de infección. La inducción de genes del ciclo celular en respuesta al rizobio se vio afectada en las raíces silenciadas, sugiriendo que estos factores de transcripción podrían promover el desarrollo de nódulos mediante la activación de divisiones celulares corticales que participan en la formación del primordio del nódulo. A su vez, ensayos de sobreexpresión permitieron demostrar que *PvNF-YA1* contribuye a la selección de cepas de rizobio que son más eficientes en la formación de nódulos. Por otro lado, se llevó a cabo la caracterización de una proteína de la familia GRAS, denominada SIN1 (Scarecrow like 13 Involved in Nodulation), que interactúa físicamente con la subunidad *PvNF-YC1*, previamente vinculada al proceso de nodulación. Ensayos de silenciamiento mostraron que SIN1 desempeña una función

importante tanto en la elongación de raíces laterales como en el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno y en la progresión de la infección bacteriana durante la interacción simbiótica. El presente trabajo de tesis contribuye a sustentar la relevancia de los complejos de transcripción multiméricos en la capacidad de las plantas para integrar y responder a múltiples factores ambientales.

INTRODUCCIÓN

1. Importancia del nitrógeno en la producción vegetal

El nitrógeno es un constituyente fundamental de moléculas esenciales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas y otros componentes celulares. El nitrógeno es el elemento más abundante en nuestra atmósfera, constituyendo casi el 78 % (v/v) de la misma. No obstante, el nitrógeno molecular (N_2) es un elemento muy estable, y por esa razón no es utilizable por los organismos vivos, excepto por las pocas especies que tienen la capacidad de convertirlo en formas que pueden ser incorporadas al metabolismo. De hecho, las plantas, los animales y la mayoría de los microorganismos, sólo pueden utilizar nitrógeno combinado, es decir, nitrógeno integrado en un compuesto químico. Las plantas y la mayoría de los microorganismos son dependientes de formas inorgánicas de este elemento, como nitratos (NO_3), amonio (NH_4), etc, mientras que los animales requieren nitrógeno orgánico obtenido directa o indirectamente de las plantas. El nitrógeno combinado se encuentra en los suelos en concentraciones muy bajas y constituye uno de los principales factores limitantes del desarrollo de los vegetales y la productividad agraria. El aporte de cantidades óptimas de nitrógeno conduce a la obtención de forrajes y granos con mayor contenido proteico. Para suplir el déficit de nitrógeno de los suelos se desarrolló el proceso de Haber-Bosh para la producción industrial de grandes cantidades de amoníaco (NH_3), el cual es utilizado como fertilizante nitrogenado en los sistemas agrícolas. Este proceso consiste en la reacción de nitrógeno e hidrógeno gaseosos para producir amoníaco.



Como la reacción natural es muy lenta, se acelera con un catalizador de hierro (Fe^{3+}) y óxidos de aluminio (Al_2O_3) y potasio (K_2O) permitiendo que el equilibrio se alcance con mayor rapidez. Los factores que aumentan el rendimiento son las condiciones de alta

presión (150-300 atmósferas) y altas temperaturas (400-500 °C), resultando en rendimientos que oscilan entre el 10 y 20 %. Se estima que el 1% de la energía mundial está destinada a este proceso.

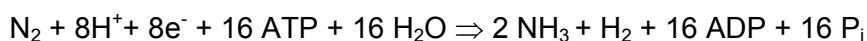
En agricultura, el uso de fertilizantes nitrogenados no suple las carencias de nitrógeno a escala mundial y su producción tiene un alto costo económico y energético. A esto, hay que añadir la relativa baja eficiencia de la aplicación de los fertilizantes, y el peligro potencial para el medio ambiente que entraña su uso indiscriminado. Se ha reportado que el arrastre excesivo de compuestos nitrogenados por las corrientes de agua puede provocar la eutrofización de ríos y lagos, con la consiguiente destrucción de los organismos que dependen del oxígeno (Robertson and Vitousek, 2009). Además, parte del amoníaco utilizado en las plantaciones es transformado en nitratos y nitritos, los cuales percolan en la tierra contaminando tanto las aguas subterráneas como superficiales. Esto genera un impacto negativo en la salud humana, ya que los nitratos/nitritos presentes en el agua consumida convierten la hemoglobina de la sangre en metahemoglobina, la cual reduce la cantidad de oxígeno que se transporta en la sangre. Hay también evidencias de la aparición de nitrosaminas en el aparato digestivo humano, que proceden de la reacción de los nitratos y nitritos ingeridos con aminas introducidas en la dieta alimenticia, y cuyo carácter cancerígeno fue puesto de manifiesto por Magee and Barnes (1956). Sumado a esto, parte de los compuestos nitrogenados de los fertilizantes se liberan en forma de gases (N_2O , NO_x , NH_3) a la atmósfera, contribuyendo al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida.

A pesar de los altos costos energéticos y ambientales que implica la producción de fertilizantes industriales, un nuevo informe de la *Food and agricultural organization* (FAO) sostiene que el consumo mundial de fertilizantes crecerá un 1,8 % anual hasta 2018 para satisfacer la demanda alimentaria. Frente al proceso de fijación industrial, la fijación biológica representa una alternativa más favorable, que se incluye dentro de lo que se ha dado en llamar agricultura sustentable, y su potenciación disminuiría no sólo

el gasto de una fertilización convencional, sino también los peligros que conlleva su abuso.

2. Fijación biológica de nitrógeno

Para que el nitrógeno pueda ser asimilado por las plantas, es necesario que se encuentre en una forma reducida. Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reducción de N_2 son ciertas bacterias, cianobacterias, algas cianofíceas (algas azul-verdosas) y actinomicetos, a través del proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Dixon and Kahn, 2004). La FBN consiste en una reacción metabólica que combina el N_2 con hidrógeno para formar amoníaco y es llevada a cabo por el complejo enzimático nitrogenasa, presente exclusivamente en estos organismos, mediante la siguiente reacción:



La estequiometría de la reacción muestra un alto consumo de energía en la forma de ATP y equivalentes de reducción. Además, el complejo nitrogenasa es muy sensible al oxígeno, por lo que la reducción de N_2 mediante la FBN debe realizarse en un ambiente anaerobio o microaerobio (Zumft and Mortenson, 1975).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan una muy amplia diversidad taxonómica y reducen el N_2 en diferentes condiciones ecológicas, esto es, en vida libre o en asociación más o menos estrecha con plantas. Los microorganismos que llevan a cabo la FBN reciben el nombre de diazótrofos (*azoe*: nitrógeno; *trofos*: alimentación). Entre las bacterias fijadoras en vida libre se encuentran las anaerobias estrictas y facultativas, aerobias y fotótrofas. Estas tienen un escaso rendimiento fijador, debido a que consumen mucha energía en el proceso y los compuestos necesarios para obtener

tal energía son poco abundantes en la biosfera circundante. Los diazótrofos fotosintéticos pueden utilizar la energía solar para conducir la FBN, razón por la cual las algas azul-verdosas fijadoras son los microorganismos libres de mayor importancia ecológica ya que son los principales fijadores de nitrógeno en los sistemas marinos. Los organismos más eficientes son aquellos que se asocian con las plantas, como es el caso del género *Rhizobium* (Vitousek et al., 2002).

El grupo de bacterias conocido colectivamente como rizobios induce la formación de estructuras diferenciadas llamadas nódulos, localizadas generalmente en la raíz de las leguminosas, que proporcionan a las bacterias un ambiente fisiológico adecuado para la FBN: baja presión de oxígeno y suministro de nutrientes, principalmente fuentes de carbono derivadas de la fotosíntesis. En el interior de estas estructuras se localizan los microorganismos (rizobios) desarrollando una simbiosis mutualista con la planta. Esta estrecha relación entre organismos eucariotas y procariotas representa un modelo biológico experimental muy interesante para su estudio y, desde el punto de vista económico y ecológico, ha abierto un campo de aplicación sumamente prometedor en la agricultura.

3. Importancia mundial de las leguminosas

Las leguminosas (*Fabaceae*) constituyen la tercera gran familia de plantas superiores y ocupan el segundo lugar, después de los cereales (*Gramineae*), en importancia agronómica por su utilización en la alimentación humana, forraje para el ganado y materia prima para la industria (Graham and Vance, 2003). Entre las leguminosas más importantes desde el punto de vista agronómico podemos mencionar a la soja (*Glicine max*), el poroto (*Phaseolus vulgaris*), el maní (*Arachis hypogaeae*), la arveja (*Pisum sativum*), la alfalfa (*Medicago sativa*) y el garbanzo (*Cicer arietinum*) (Figura 1).

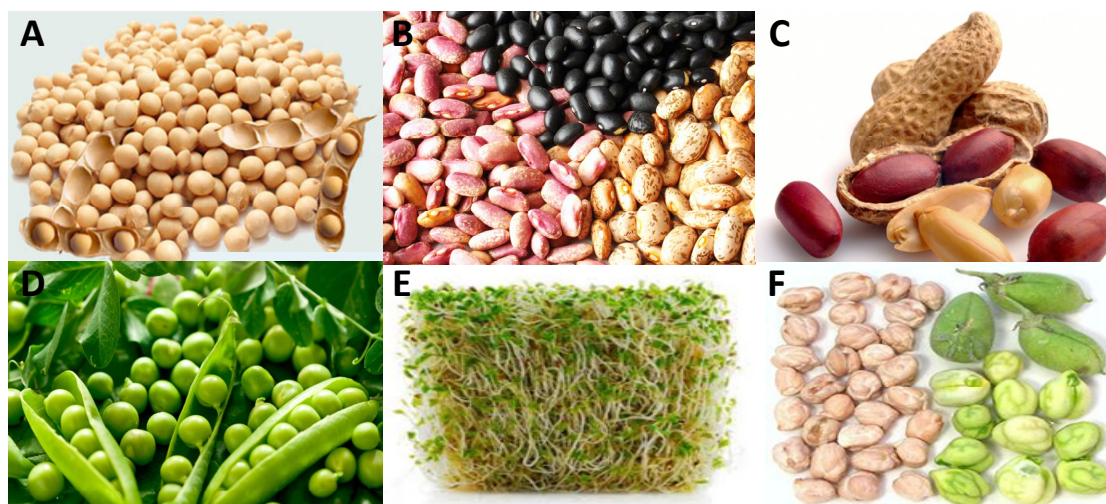


Figura 1. Leguminosas de importancia agronómica. A: Soja. B: Poroto. C: Maní. D: Arveja. E: Alfalfa. F: Garbanzo.

En los últimos años la demanda de leguminosas se ha incrementado, siendo mayor el consumo que su producción en casi todo el mundo. Aún así, el consumo de leguminosas disminuye cuando mejora el nivel de vida de la población, dado que ésta puede acceder a otras fuentes proteicas de alto valor alimenticio más costosas, pero que no se incrementa tan velozmente como las fuentes vegetales. Por esto, las leguminosas son una solución rápida y poco dificultosa al problema alimentario humano y también para el abastecimiento de proteínas a la tercera parte del mundo, ya que varias leguminosas como soja, poroto y alfalfa son los cultivos con mayor contenido de proteínas, fibras y vitaminas.

Las legumbres se destacan fundamentalmente por el aporte de proteínas, con valores superiores al 25 % del peso total, mientras que alimentos como arroz, trigo y maíz (cereales) poseen un 12 %, la carne un 20 %, el pescado un 18 % y la leche fluida un 3 %. El contenido proteico de la soja puede alcanzar valores de 38 a 50 % según la variedad. También son fuentes importantes de hidratos de carbono, con valores que varían entre el 56-58 %, mientras que los cereales las superan llegando al 70 %. El aporte de grasa es del 1 al 1,6 %. En cuanto a los minerales, son buena fuente de calcio, hierro y fósforo. Las vitaminas que aportan son los principales componentes del

grupo B: tiaminas (B1), riboflavina (B12) y niacina (B5) (Filli, 2002). Estos valores no sólo tienen implicancia nutricional, sino también económica.

Los datos mencionados sugieren la factibilidad de utilizar las leguminosas en los regímenes alimentarios y en los programas sociales en forma más racional, como estrategia para prevenir la desnutrición pluricarencial. Esto significa, que los pueblos que enfrentan problemas de desnutrición no tengan que depender de las llamadas "fuentes de proteínas de alta calidad", las cuales son mayormente importadas.

Por otra parte, las leguminosas representan un tercio de la producción mundial de cultivos y resultan de gran utilidad en la rotación de cultivos, debido a su capacidad de fijar nitrógeno gracias a la asociación simbiótica con rizobios, aumentando así el contenido de nitrógeno disponible en el suelo para el cultivo siguiente. De esta manera se disminuye el uso de fertilizantes sintéticos, cuyos efectos adversos al medio ambiente ya han sido descriptos. Se estima que 40-60 millones de toneladas de nitrógeno son fijadas anualmente a partir del cultivo de leguminosas (Smil, 1999), ahorrando cerca de US\$10 mil millones en fertilizantes nitrogenados (Graham and Vance, 2003).

4. *Phaseolus vulgaris*

Phaseolus es un género dentro de la familia *Fabaceae* que incluye unas cincuenta especies de plantas, todas nativas de América. Las especies de este género son conocidas vulgarmente como porotos, frijoles, habichuelas o judías, de acuerdo a las distintas regiones en las que se encuentran. El poroto es un diploide con $2n=22$ cromosomas. Normalmente se autopoliniza, con sólo una pequeña proporción de polinización externa; es decir, es una especie predominantemente autógama. Debido a su alto valor nutricional, los granos de *P. vulgaris* son utilizados como complemento de

las dietas ricas en hidratos de carbono, siendo África y América Latina los principales consumidores (Broughton et al., 2003). La distribución actual del cultivo de poroto abarca una amplia zona geográfica, desde el norte de México hasta el noroeste Argentino. Una característica de este cultivo es su versatilidad, pudiéndose adaptar a diversas condiciones climáticas y regiones, siendo preferentes las regiones templadas o tropicales. El período vegetativo puede variar entre 70 a 200 días dependiendo del fotoperíodo, por lo que puede utilizarse como un excelente cultivo rotativo, o como una fuente continua de semillas para alimento. En conjunto, la diversidad del sistema de producción que ofrece el poroto y sus propiedades nutritivas lo han convertido en la leguminosa de grano más importante en términos de alimentación humana.

Se reconocen dos grandes centros geográficos de diversificación genética y domesticación de *P. vulgaris*: Mesoamérica (norte de México hasta Colombia) y la región de los Andes del Sur (Ecuador, Bolivia, Perú y noroeste argentino). Esta teoría se basa en el análisis de diversos rasgos de las poblaciones de poroto, tales como el tamaño y color de las semillas (Figura 2), la morfología de la planta, tipificación genética de proteínas de semilla llamadas faseolinas, isoenzimas y análisis de marcadores moleculares (Gepts et al., 1986; Singh et al., 1991; Velasquez and Gepts, 1994; Tohme, 1996; Kwak and Gepts, 2009). La existencia de dos pools génicos que evolucionaron en regiones geográficas distintas y aisladas y que fueron domesticadas en forma independiente representa un escenario único entre los cultivos. Si bien la población del norte de Perú y Ecuador fue considerada durante muchos años la población ancestral de la que se originó *P. vulgaris* (Kami et al., 1995), estudios recientes de AFLP y variaciones nucleotídicas sugieren un origen mesoamericano (Rossi et al., 2009; Bitocchi et al., 2012).

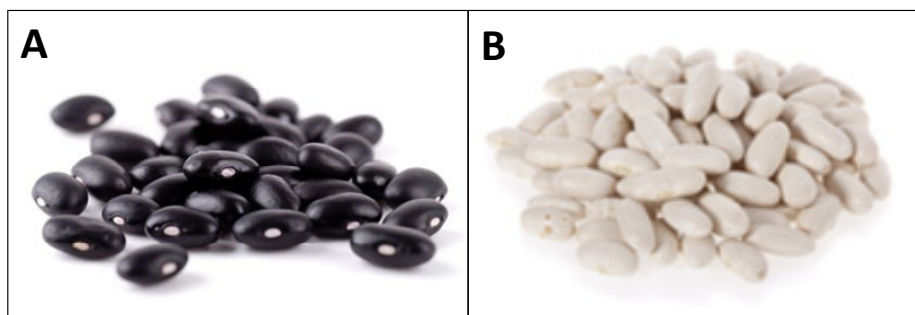


Figura 2. Variedades cultivadas de *P. vulgaris*. A. NAG12: variedad mesoamericana (color negro). B. Alubia: variedad andina (color blanco).

Durante los últimos años el cultivo de poroto se ha expandido a escala comercial y su producción se ofrece actualmente en mercados regionales e internacionales. Datos de la FAO de 2013 estiman que la producción mundial es de 23 millones de toneladas anuales. La producción histórica de Argentina oscila entre 280.000 y 300.000 toneladas por año, proveniente casi exclusivamente de la región noroeste del país, de los cuales aproximadamente el 85 % son destinados a exportación (Cámara de Legumbres de la República Argentina, CLERA, www.clera.com.ar), posicionando a nuestro país como uno de los principales exportadores junto con EEUU y Canadá, luego de Brasil e India. Los porotos argentinos cuentan con ventajas competitivas y comparativas a nivel internacional debido a su alta calidad, consecuencia de la presencia de lluvias durante el desarrollo del cultivo y su ausencia en la etapa de cosecha. A pesar de estas ventajas climáticas, la productividad de granos de poroto está muy por debajo del potencial del cultivo debido a que es una planta con un alto requerimiento de nutrientes. Normalmente los suelos empleados en la producción de poroto no tienen la suficiente cantidad de nitrógeno disponible para obtener altos rendimientos, debido a que el aporte de este nutriente desde el suelo, generado desde la reserva de materia orgánica, resulta ser insuficiente. Una alternativa a la obtención de nitrógeno por absorción radical desde el suelo, es la obtención de nitrógeno por asociación simbiótica con bacterias fijadoras de N_2 .

5. Asociación simbiótica fijadora de nitrógeno entre rizobios y leguminosas

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosas es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria, la planta y el ambiente. En general, se considera a la simbiosis mutualista como la convivencia de dos organismos no semejantes en una relación de beneficio mutuo, generándose una interdependencia fisiológica. El establecimiento de la simbiosis es un proceso desencadenado por un intercambio de señales químicas entre los dos participantes de la interacción, el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta), resultando en la activación de programas genéticos específicos de la nodulación. Esta simbiosis es la adaptación a un medio deficitario en nitrógeno, ya que en suelos ricos en este nutriente, las leguminosas utilizan preferentemente el nitrógeno inorgánico presente en el suelo. Si por el contrario, los niveles de nitrógeno disponible son bajos, la planta estimula el inicio de una interacción que conduce a la formación de nódulos fijadores de N₂.

Las plantas, en contacto con los rizobios compatibles, responden a través de una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares. Estas etapas, que pueden separarse espacial y temporalmente, se llevan a cabo en forma coordinada. Los eventos más tempranos tienen lugar en las células de la epidermis, donde son evidentes cambios en la morfología del pelo radical. Paralelamente, en el córtex, se activa la división celular que dará lugar al primordio de nódulo, donde se alojarán las bacterias que logren invadir las células de la raíz.

5.1. Infección y organogénesis del nódulo

Cuando las plantas leguminosas se encuentran en condiciones de deficiencia de nitrógeno liberan a la rizósfera moléculas que actúan como quimioattractantes

bacterianos. Entre estos compuestos exudados se encuentran flavonoides e isoflavonoides (derivados de 2-fenil-1,4 benzopirona) y no-flavonoides, que incluyen a betaínas y ácidos aldónicos (Allan Downie, 1994; Phillips and Streit, 1996; Spaink, 2000). En respuesta a los flavonoides de la planta, los rizobios sintetizan otro tipo de moléculas de señalización, los factores de nodulación (NF, por *Nod Factor*). Los NFs son señales difusibles que activan diversos procesos de desarrollo en la planta. El NF consiste en un esqueleto oligosacárido de *N*-acetil-glucosaminas unidas por enlaces $\beta(1-4)$. Su longitud varía entre 2 y 5 residuos, dependiendo de la especie de rizobio. Presentan en el extremo no reductor un ácido graso. Además pueden llevar distintos sustituyentes, tanto en el extremo reductor como en el no reductor. La estructura básica del NF es sintetizada por las proteínas codificadas por los genes *nodA*, *nodB* y *nodC* (denominados genes *nod* generales, ya que son comunes a las distintas especies de rizobios) (Horvath et al., 1987), mientras que las modificaciones subsiguientes son llevadas a cabo por los productos de los llamados genes *nod* específicos, característicos de cada rizobio. Las diferentes modificaciones adicionales a la estructura básica del NF, junto con la longitud y el grado de saturación del ácido graso, son características de cada especie de rizobios. Estas modificaciones tienen funciones importantes en la definición de la especificidad de la interacción entre la planta hospedadora y las especies de rizobios compatibles (Lerouge, 1990).

La infección bacteriana por lo general ocurre a través de los pelos radicales, que cambian su eje de crecimiento y se curvan alrededor de los rizobios, atrapando las bacterias adheridas. Estas bacterias crecen y forman focos de infección donde se degrada la pared celular, la membrana celular se invagina y se forma una estructura tubular intracelular apoplástica llamada hilo de infección (abreviada IT por infection thread), a través del cual la bacteria trasvasa el pelo y avanza, para eventualmente llegar hasta el córtex de la raíz (Mylona et al., 1995) (Figura 3A). No todos los ITs prosperan; algunos de ellos abortan en el pelo radical (van Brussel et al., 1992; Gage, 2004; Geurts et al., 2005). El desarrollo coordinado del IT y el primordio de nódulo es

clave en la formación nodular. Simultáneamente a los cambios que ocurren en la epidermis, las células corticales subyacentes al sitio de infección reactivan su ciclo celular dando lugar a divisiones periclinales y anticlinales que van a formar el primordio de nódulo (Kondorosi and Kondorosi, 2004). El IT se elonga y finalmente alcanza las células del primordio que se están dividiendo (Figura 3A), donde las bacterias son liberadas al interior de la célula (Roth and Stacey, 1989). Las bacterias quedan rodeadas por una membrana vegetal, derivada de la membrana citoplasmática, y se diferencian en estructuras similares a organelas llamadas simbiosomas (Roth and Jeon, 1988), dentro de las cuales las bacterias se diferencian a bacteroides y comienzan a fijar el N_2 (Figura 3B). El nódulo permite además el intercambio de nutrientes utilizando el tejido vascular periférico.

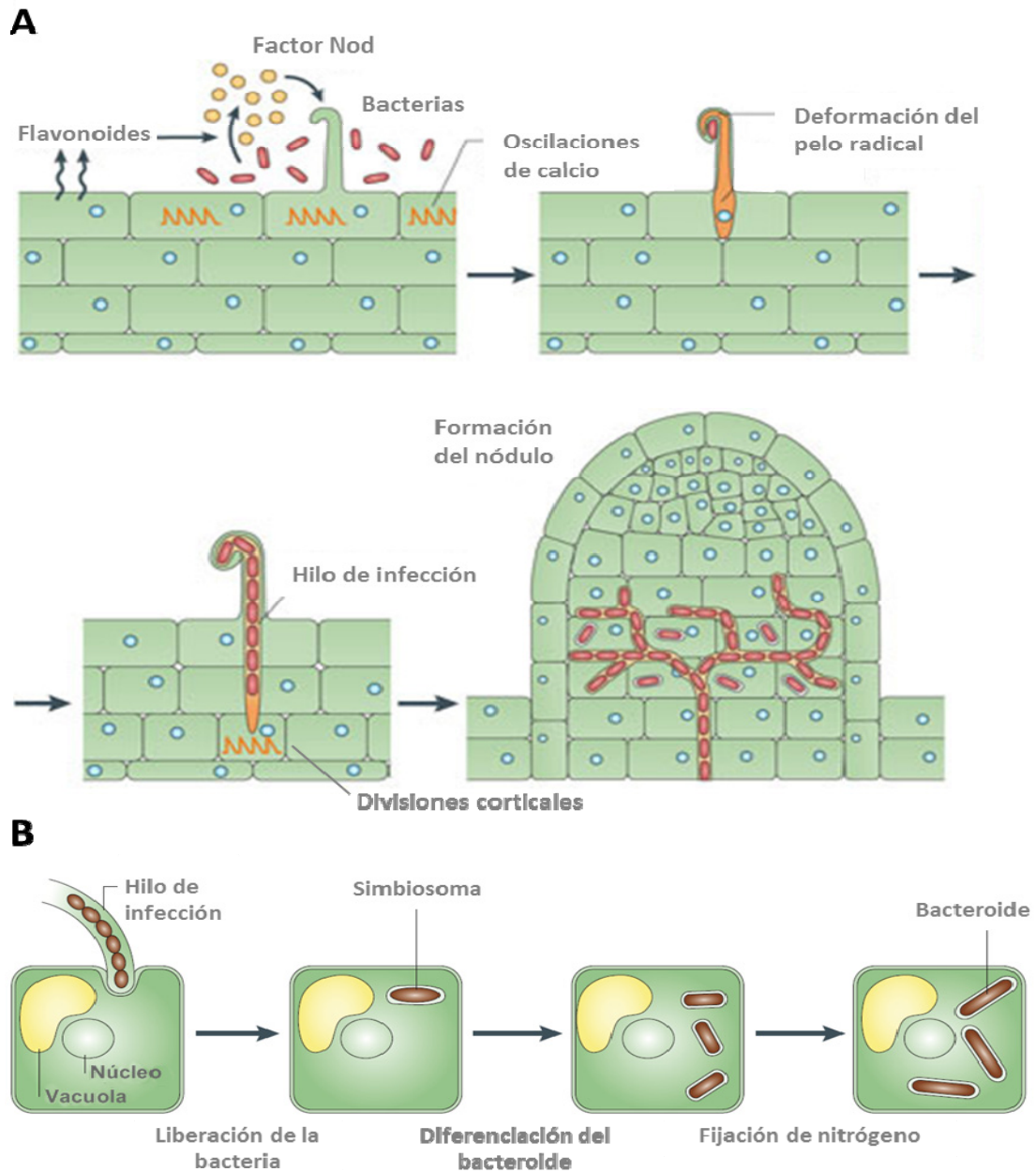


Figura 3: Simbiosis entre rizobios y raíces de leguminosas.

A. Los procesos de infección y organogénesis del nódulo ocurren coordinadamente y se encuentran altamente regulados. La interacción se inicia cuando los flavonoides son liberados por la raíz de la planta a los rizobios presentes en la rizósfera, los cuales en respuesta producen NF. La percepción del NF por receptores de la raíz activa la vía de señalización de la simbiosis, lo que conduce a las oscilaciones de calcio (curvas naranjas), inicialmente en las células epidérmicas, pero más tarde también en las células corticales, previo a la colonización. Los cambios morfológicos se inician con la deformación del pelo radical, atrapando la bacteria en el foco de infección. Para que la infección continúe, es necesaria una degradación localizada de la pared celular y la formación del IT. El rizobio continúa dividiéndose monoclonalmente acompañando el crecimiento del IT hacia el interior de la raíz. Paralelamente, ocurren divisiones corticales (córtez interno o externo, dependiendo de la especie de leguminosa), por debajo del sitio de la infección rizobiana, dando origen al primordio de nódulo. Los IT crecen hacia los nódulos emergentes y se ramifican dentro del tejido del nódulo. Adaptado de Oldroyd (2013).

B. Las bacterias del IT se liberan dentro de las células del nódulo en compartimentos rodeados por una membrana llamados simbiosomas. Dentro de estos simbiosomas las bacterias se diferencian a bacteroides y llevan a cabo la fijación de nitrógeno. Adaptado de Jones et al (2007).

Existen dos grandes tipos de nódulos en las leguminosas de acuerdo a su origen y morfología: determinados e indeterminados (Figura 4). El tipo de nódulo está determinado por la planta hospedante. Para nódulos indeterminados, los primeros eventos de división celular se producen anticlinalmente en el interior del córtex, seguido por divisiones periclinales en la endodermis y el periciclo (Xiao et al., 2014). Colectivamente, estas divisiones conducen a la formación de los primordios de nódulos. Los nódulos indeterminados tienen un meristema persistente, lo que resulta en nódulos de forma cilíndrica, como es el caso de los nódulos de alfalfa, trébol (*Trifolium repens*), arveja y *Medicago truncatula*. Estos nódulos presentan un gradiente de desarrollo que da lugar a zonas claramente diferenciadas: la zona I o meristemática, la zona II o de infección, donde las bacterias son liberadas al interior de las células vegetales; la zona intermedia II-III, donde se produce la diferenciación a bacteroides, la zona III o de fijación de nitrógeno y la zona IV o de senescencia, donde tanto las células vegetales como las bacterianas degeneran. El meristema apical produce continuamente nuevas células que son infectadas por bacterias. Estos nódulos también poseen un sistema vascular poco ramificado (Ferguson et al., 2010). Los nódulos determinados, por otra parte, son generalmente de forma esférica, carecen de un meristema persistente, y no muestran un gradiente de desarrollo evidente. Los primeros eventos de división celular de un nódulo determinado ocurren subepidérmicamente en el córtex externo. Existen excepciones, como los nódulos de *Lotus japonicus*, que no presentan divisiones celulares subepidérmicas iniciales (Wopereis et al., 2000). Las divisiones celulares en el córtex cesan muy temprano en el desarrollo y el tamaño del nódulo crece debido a la expansión celular. En la madurez, los nódulos determinados presentan una población homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno. Estos nódulos son funcionales durante 14 días aproximadamente. Cuando los nódulos envejecen, se forman nuevos nódulos en porciones recientemente desarrolladas de la raíz (Rolfe and Gresshoff, 1988). Los nódulos determinados también forman lenticelas, que son estructuras que mejoran el intercambio de gases. Las leguminosas que forman nódulos determinados

son predominantemente especies tropicales y subtropicales, como la soja y el poroto, pero también otras especies de climas templados, como *L. japonicus*.

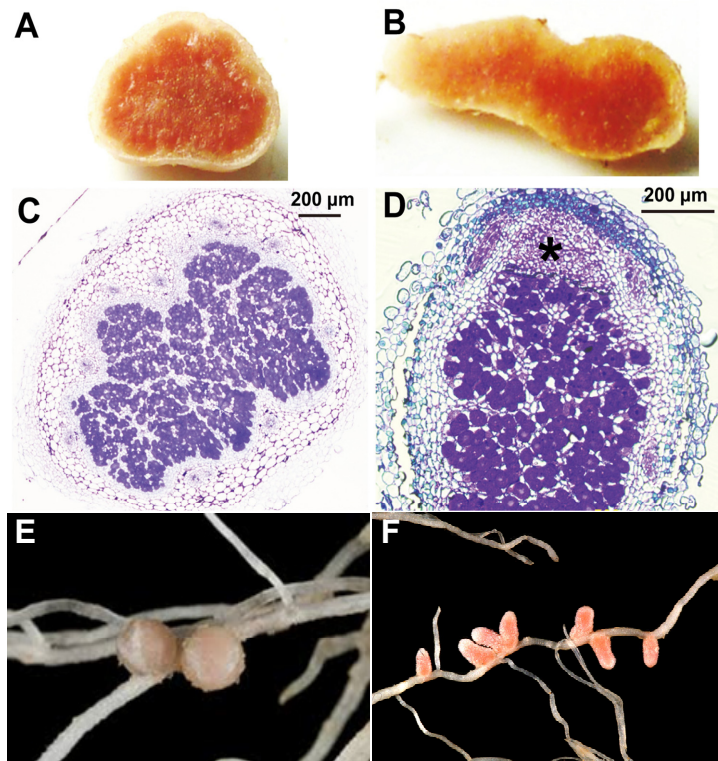


Figura 4. Nódulos determinados e indeterminados.

(A-B) Corte de nódulos fijadores de nitrógeno de *Vigna unguiculata* de tipo determinado (A) y *Leucaena leucocephala* de tipo indeterminado (B).

(C-D) Secciones ultrafinas de nódulos de *V. unguiculata* (C) y *L. leucocephala* (D). El asterisco indica la zona meristémica de los nódulos indeterminados de *L. leucocephala* (D).

(E-F) Nódulos fijadores de nitrógeno de *P. vulgaris* (determinados, E) y *M. truncatula* (indeterminados, F). Adaptado de Li et al (2013).

5.2. Bases moleculares de la nodulación

Para dar impulso a la investigación en leguminosas, la comunidad internacional ha adoptado a *L. japonicus* y *M. truncatula* como plantas modelo. Su genoma diploide, ciclo de vida corto, susceptibilidad a la transformación por *Agrobacterium*, y otras ventajas biológicas las distinguen de otras leguminosas.

En el genoma de las leguminosas se encuentran codificadas todas las funciones necesarias para la organogénesis del nódulo, tal como lo demuestra el caso de ciertos mutantes que nodulan espontáneamente en ausencia de rizobio (Tirichine et al., 2006b; Tirichine et al., 2006a). Por esto, el estudio genético de las plantas sería suficiente para dilucidar el mecanismo de la organogénesis. A partir del estudio de las leguminosas modelo y sus mutantes se han identificado numerosos genes que son requeridos para

la organogénesis del nódulo y la infección rizobiana (Jones et al., 2007; Oldroyd and Downie, 2008; Oldroyd, 2013).

El NF es percibido en *Lotus* a través del producto de los genes *nfr1* (*Nod factor receptor-1*) y *nfr5* (*Nod factor receptor-5*), que codifican receptores transmembrana tipo LysM (*N-acetyl-glucosamine binding lysin motifs*) con dominios intracelulares tipo quinasa (Madsen et al., 2003; Radutoiu et al., 2003; Radutoiu et al., 2007; Broghammer et al., 2012). También se identificaron estos receptores en otras leguminosas: NFR5 en soja (Indrasumunar et al., 2010), LYK3 (*LysM receptor like kinase III*) y NFP (*Nod factor perception*) en *M. truncatula* (Limpens and Bisseling, 2003; Arrighi et al., 2006). Mutaciones de pérdida de función en estos genes resultan en un fenotipo defectivo en la simbiosis nodular (Nod⁻). Recientemente se ha demostrado en *L. japonicus* que la expresión ectópica de NFR1 y NFR5 resulta en la formación de nódulos espontáneos y la expresión de genes relacionados con la nodulación, en ausencia de rizobios (Ried et al., 2014). Se han desarrollado modelos que permiten identificar los sitios de interacción entre el NF y los dominios LysM de éstos receptores (Mulder et al., 2006; Radutoiu et al., 2007). Tanto la función como la localización de estos receptores se encuentran reguladas por ligasas de ubiquitina tipo E3 como LIN y PUB1, que permitirían modular la respuesta al rizobio (Kiss et al., 2009; Mbengue et al., 2010). Además del NF, los exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) presentes en la pared de las bacterias participan en el intercambio de señales que resultan en el establecimiento de la simbiosis. Recientemente se ha identificado un receptor de exopolisacáridos (EPR3) que media el reconocimiento de los rizobios en *L. japonicus* (Kawaharada et al., 2015). La percepción temprana de los NF provoca oscilaciones en las concentraciones de calcio. Este fenómeno es conocido como “*calcium spiking*” y ocurre tanto alrededor como dentro del núcleo de las células epidérmicas, luego de la percepción de los NF (Ehrhardt et al., 1996). Los productos de diferentes genes de los géneros *Lotus* y *Medicago* contribuyen a la vía de transducción de la señal: SYMRK (*Symbiosis receptor like kinase* en *L. japonicum*) o DMI2 (*Does not make infection 2* en *M. truncatula*), un

receptor tipo quinasa con un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (Endre et al., 2002; Stracke et al., 2002), CASTOR y POLLUX/DMI1, un canal catiónico putativo (Ané et al., 2004; Imaizumi-Anraku et al., 2005), como así también las nucleoporinas NUP133 y NUP85 y NENA (Kanamori et al., 2006; Saito et al., 2007) son todos necesarios para que ocurra el “*calcium spiking*” (Miwa et al., 2006). Estas oscilaciones son percibidas por una quinasa dependiente de calcio y calmodulina, CCaMK/DMI3 (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004), que actúa junto con la proteína CYCLOPS o IPD3 (*Interacting Protein of DMI3*) mediando la cascada de señalización iniciada en la membrana plasmática (Messinese et al., 2007; Yano et al., 2008; Horváth et al., 2011). El complejo CCaMK/CYCLOPS activa de manera directa o indirecta un grupo de factores de transcripción. Entre ellos se encuentran ERN (*ERF Required for Nodulation*), dos factores de transcripción de la familia GRAS denominados NSP1 y NSP2 (Nodulation Signalling Pathway 1 y 2), NF-Y (Nuclear Factor Y) y NIN (Nodule Inception) (Schauser et al., 1999; Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Combier et al., 2006; Heckmann et al., 2006; Andriankaja et al., 2007; Marsh et al., 2007; Soyano et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado que DMI3 fosforila a CYCLOPS y que el complejo CCaMK/CYCLOPS fosforilado se une al promotor del gen *NIN* activando su transcripción (Singh et al., 2014) (Figura 5). Esta vía de señalización y la activación de factores de transcripción culminan en la inducción de los genes conocidos como genes de nodulación o nodulinas (Scheres et al., 1990; Journet et al., 1994). Entre estas nodulinas pueden mencionarse RIP1, una peroxidasa inducida en la epidermis en etapas muy tempranas de la infección y *ENOD11* (*Early Nodulin 11*), el cual se induce inicialmente en la epidermis y luego en las células corticales, participando en la formación del nódulo (Cook et al., 1995; Gleason et al., 2006). También puede mencionarse el caso de *ENOD40*, el cual codifica un RNA con una compleja estructura secundaria que contiene pequeños marcos de lectura abiertos, y que es requerido para la división celular en el córtex. El transcripto de este gen se acumula durante el

desarrollo del primordio del nódulo, pero no se induce en la epidermis (Crespi et al., 1994).

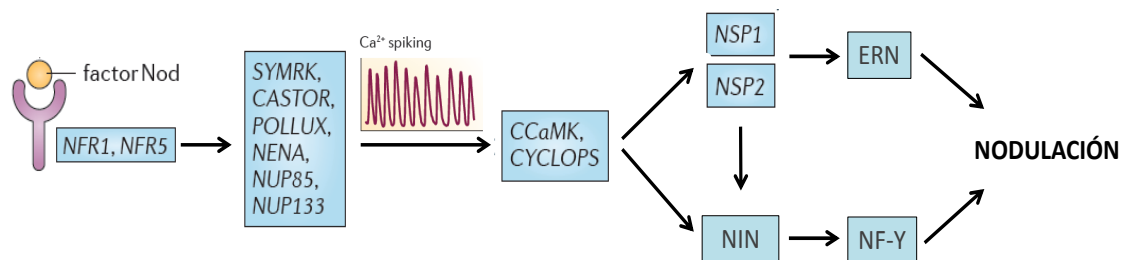


Figura 5. Vía de señalización de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre raíces de leguminosas y rizobios. Los receptores LysM-RLK (NFR) perciben los factores Nod producidos por los rizobios. Al mismo tiempo, un receptor tipo LRR-RLK SYMRK se activa por un mecanismo aún desconocido. La señal percibida por estos receptores desencadena oscilaciones de calcio dentro y alrededor del núcleo (*calcium spiking*), las cuales requieren la acción del canal catiónico POLLUX y las proteínas del poro nuclear o nucleoporinas (NENA y NUPs). Las oscilaciones de calcio son percibidas por la quinasa dependiente de calcio y calmodulina CCaMK, la cual interactúa físicamente con CYCLOPS. Los factores de transcripción NSP1 y NSP2, en conjunto con ERN, promueven la activación transcripcional de nodulinas. A su vez, el factor de transcripción NIN es requerido tanto en la epidermis como en el córtex para activar los miembros de la familia NF-Y que están involucrados directa o indirectamente en la activación de genes del ciclo celular que promueven las divisiones celulares en el córtex. Adaptado de Oldroyd (2013).

Considerando la importancia de las hormonas en la organogénesis y desarrollo de los órganos de la planta, no es sorprendente que cumplan un rol crucial en el proceso de formación del nódulo. La relación entre auxinas y citoquininas (con efectos opuestos entre sí) posee una función clave y compleja en la inducción de la división celular que ocurre en el córtex. Por un lado se comprobó que el tratamiento con inhibidores del transporte de auxinas inducen la formación de pseudonódulos y aumentan la expresión de *ENOD40* (Hirsch et al., 1989; Hirsch and Fang, 1994; Fang and Hirsch, 1998; Mathesius et al., 2000). Por otro lado, se ha demostrado que las citoquininas cumplen una función clave durante la nodulación. Se ha descrito que un mutante de ganancia de función en el receptor de citoquininas de *L. japonicus* (*Lotus* histidine kinase - LHK1) produce nódulos en ausencia de rizobio (Tirichine et al., 2007). Además, mutantes con pérdida de función del receptor LHK1 (Murray et al., 2007) o con niveles reducidos del transcripto en *M. truncatula* mediante RNAi (Gonzalez-Rizzo et al., 2006) llevaron a una dramática disminución en la formación de nódulos. Los mutantes *lhk1* pierden la capacidad de formar nódulos, pero la iniciación de la infección bacteriana no se ve

alterada (Tirichine et al., 2007). Estos estudios demuestran que las citoquininas poseen un rol central en la organogénesis del nódulo en el córtex, pero no participarían en la infección bacteriana en la epidermis.

Además de las auxinas y citoquininas, otras hormonas, como giberilinas y brasinoesteroides inducen la formación de nódulos. Mutaciones que provocan una reducción de los niveles de estas hormonas en arveja reducen la nodulación, y la aplicación exógena de giberelinas es capaz de rescatar el fenotipo mutante (Ferguson et al., 2005).

6. Asociación simbiótica entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*

Estudios previos realizados sobre la diversidad de las poblaciones nativas de rizobios asociados a porotos silvestres en el Noroeste de Argentina (NOA) han mostrado que la especie predominante presente en los nódulos de poroto es *Rhizobium etli* (Aguilar et al., 1998). Estudios posteriores evidenciaron que las variedades de poroto de los diferentes centros de diversificación muestran afinidad por los rizobios provenientes de la misma región (Aguilar et al., 2004). En el trabajo de Aguilar y colaboradores (2004) se observó, mediante ensayos de coinoculación, que el hospedante tiene un rol activo en la preferencia por las distintas cepas de *R. etli*. Esta preferencia está asociada a un polimorfismo del gen *nodC* de *R. etli*, que codifica una *N*-acetilglucosamina transferasa involucrada en los primeros pasos la síntesis de los NF. Su distribución se correlaciona con los centros de domesticación del poroto: cepas portadoras del alelo *nodCa* fueron predominantes en suelos de la región mesoamericana, mientras que el alelo *nodCδ* fue el más representado en los rizobios de la región andina. Asimismo, las variedades de poroto mesoamericanas son noduladas mayoritariamente por cepas del genotipo

nodCα, mientras que esta preferencia se revirtió parcialmente en el cultivar andino, sugiriendo una mayor competitividad del rizobio proveniente del mismo centro de domesticación (Aguilar et al., 2004). Esta especificidad de los cultivares mesoamericanos en la interacción sugiere la existencia de un mecanismo de reconocimiento de señales que inducirían una respuesta más eficiente en el caso de las cepas que han coevolucionado en el centro de diversificación genética.

En un intento por identificar los genes involucrados en esta respuesta más eficiente, se han aislado cDNAs de *P. vulgaris* que presentan niveles aumentados de transcritos en las etapas tempranas posteriores a la infección con linajes específicos del microsimbionte *R. etli* (Peltzer Meschini et al., 2008). A partir de la generación de bibliotecas sustractivas se detectaron mRNAs que se acumulan diferencialmente en pelos radicales de un cultivar de poroto mesoamericano inoculados con la cepa de *R. etli* SC15, representativa del genotipo *nodCα*, respecto de plantas del mismo cultivar inoculadas con una cepa predominante de la región andina 55N1 (genotipo *nodCδ*). Se identificaron 41 cDNAs que podrían tener un rol en la preferencia de las plantas mesoamericanas por las cepas de *R. etli* predominantes en este centro de diversificación genética. Entre ellos se encontró un cDNA que codifica para la subunidad C del factor de transcripción heterotrimérico de tipo NF-Y, denominado PvNF-YC1 (*Nuclear Factor Y C subunit 1*), cuyos transcritos aumentan su expresión específicamente en respuesta a las cepas de tipo *nodCα* (Peltzer Meschini et al., 2008; Zanetti et al., 2010).

7. Factores de transcripción NF-Y y su rol en la nodulación

Los NF-Ys son factores de transcripción heterotriméricos conservados evolutivamente en levaduras, mamíferos y plantas, que han emergido como importantes reguladores de la expresión génica. El complejo está compuesto por tres subunidades: NF-YA, NF-YB, y NF-YC (también conocidas en levaduras como HAP2, HAP3 y HAP5,

respectivamente). El modelo actual para la formación del complejo NF-Y funcional en mamíferos implica la dimerización de las subunidades NF-YB y NF-YC a través de la interacción de sus dominios de plegamiento tipo histonas (HFDs por *Histone Fold like Domains*) en el citoplasma, la translocación del heterodímero al núcleo y su asociación con la subunidad NF-YA para formar el complejo maduro y funcional (Figura 6) (Kahle et al., 2005). Este trímero reconoce y se une con alta especificidad a cajas CCAAT, elementos *cis* presentes en muchos promotores eucariontes, activando o reprimiendo la transcripción de los genes presentes río abajo de estas secuencias (*downstream*) (Ceribelli et al., 2008).

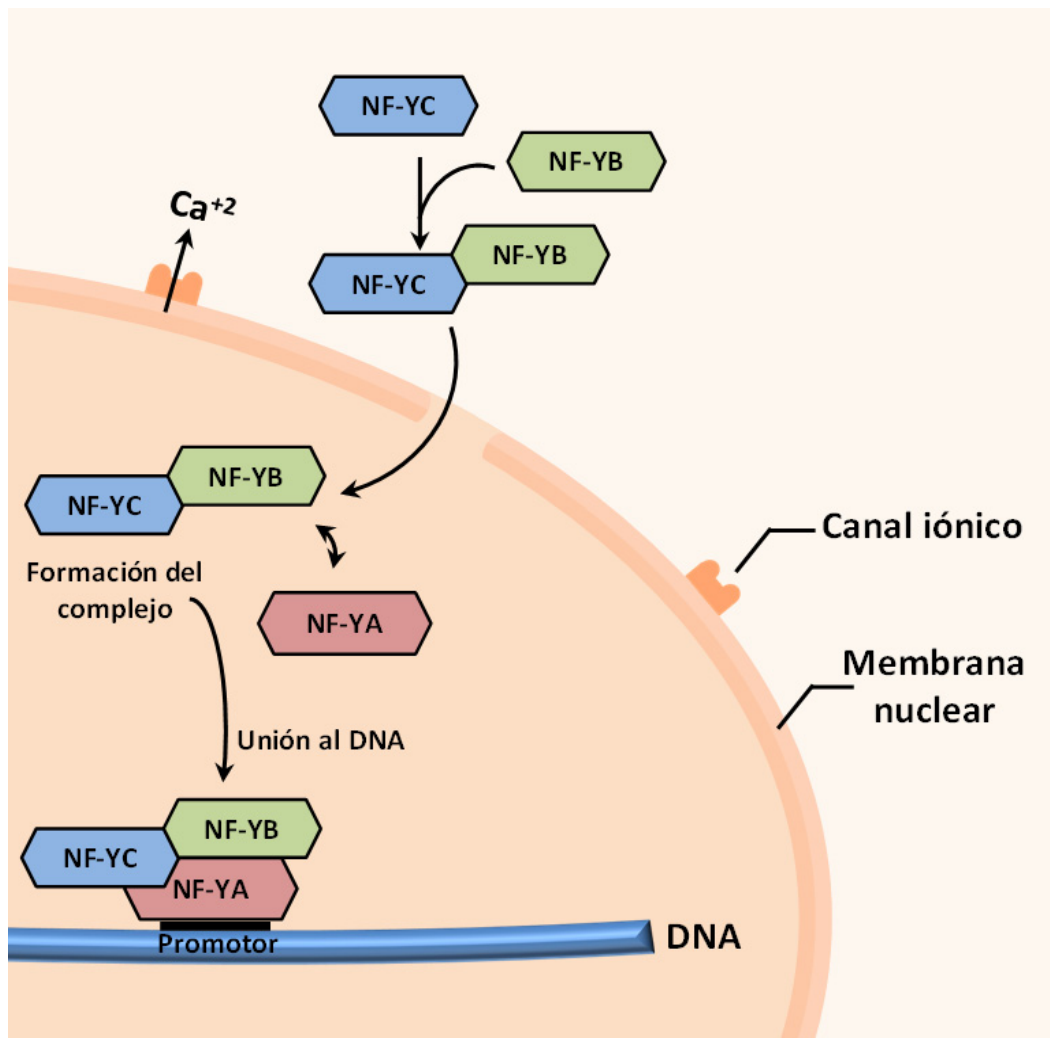


Figura 6. Formación del trímero NF-Y. El factor de transcripción NF-Y está compuesto por tres subunidades, NF-YA, -YB y -YC. En mamíferos, NF-YB y NY-YC se asocian en el citoplasma, para formar un heterodímero. Este dímero es translocado al núcleo, donde se une a la subunidad NF-YA para formar el trímero maduro. Finalmente el complejo se une a los elementos *cis* presentes en los promotores para regular la transcripción de genes específicos.

En levaduras y metazoos, cada subunidad NF-Y está codificada por uno o dos genes, mientras que en plantas estas subunidades se encuentran representadas por familias génicas. Aún se desconoce si esta expansión ha sido el resultado de una diversificación funcional para hacer frente a las diferentes respuestas o programas de desarrollo específicos de la planta. El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica 10 subunidades NF-YA, 10 NF-YB y 10 NF-YC, mientras que en arroz (*Oryza sativa*), estas familias poseen 10, 11 y 7 miembros, respectivamente (Siefers et al., 2009; Petroni et al., 2012; Laloum et al., 2013). El análisis de estas familias en leguminosas mostró la presencia de 8, 19 y 11 miembros de las familias NF-YA, -YB y -YC, respectivamente, en *M. truncatula*, mientras que en soja estas familias se han ampliado a 20, 39 y 27 miembros de cada subunidad, respectivamente (Laloum et al., 2013). Sin embargo, la anotación de *M. truncatula* y soja incluye dos grupos de proteínas más divergentes que contienen HFDs (denominados NC2 β y NC2 α) dentro de las familias NF-YB y -YC, respectivamente.

La expansión de la familia de genes NF-Y en las plantas podría producir teóricamente más de mil combinaciones alternativas heterotriméricas únicas (Siefers et al., 2009). Esto ha llevado a la especulación de que esta asociación combinatoria entre las subunidades NF-Y podría proporcionar un sistema de regulación versátil y flexible que integra señales de desarrollo y ambientales para afinar las respuestas transcripcionales. Existen dos estudios sistemáticos donde se analizan las interacciones entre las subunidades NF-Y de *Arabidopsis* utilizando el sistema de doble híbrido de levadura (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012), en los cuales se llega a la conclusión de que la mayoría de las subunidades NF-YB y NF-YC pueden interactuar promiscuamente entre sí, y que la formación de heterodímeros a través del HFD parece ser un requisito previo para la translocación al núcleo, la asociación con la subunidad NF-YA y la posterior unión al DNA. Además, se ha demostrado que los complejos NF-Y o sus subunidades individuales pueden asociarse con otros reguladores transcripcionales, como factores de transcripción de las familias bZIP

(basic leucine Zipper) (Liu and Howell, 2010) y MADS (llamados así a partir de los nombres de los genes en cuya secuencia fue identificada la caja MADS por primera vez: MCM1 de *Saccharomyces cerevisiae*; AGAMOUS *Arabidopsis thaliana*; DEFICIENS de *Antirrhinum majus*, y SRF de *Homo sapiens*) (Masiero et al., 2002), ampliando aún más el número de complejos multiméricos putativos que pueden formarse.

El complejo NF-Y juega un papel central en el control de la proliferación celular y primeras etapas del desarrollo de mamíferos (Dolfini et al., 2012). En plantas, enfoques de genética directa y reversa han conducido a la identificación de varios genes que codifican subunidades de NF-Y requeridas para la correcta ejecución desarrollo de los programas de desarrollo, tales como la embriogénesis (Lotan et al., 1998; Kwong et al., 2003), germinación de las semillas (Kumimoto et al., 2013; Siriwardana et al., 2014), biogénesis del cloroplasto (Miyoshi et al., 2003), floración (Ben-Naim et al., 2006; Kumimoto et al., 2010) y el elongación de las raíces (Ballif et al., 2011).

En leguminosas, miembros de cada familia génica de las subunidades de NF-Y han sido implicados en el desarrollo de nódulos indeterminados (*MtNF-YA1* y *MtNF-YA2* en *M. truncatula*) y determinados (*LjNF-YA1* en *L. japonicus* y *PvNF-YC1* en *P. vulgaris*), donde actúan como componentes de una cascada de activación transcripcional jerárquica en la vía de señalización de la nodulación (Combier et al., 2006; Zanetti et al., 2010; Laloum et al., 2013; Soyano et al., 2013; Laloum et al., 2014; Laporte et al., 2014). En *M. truncatula*, *MtNF-YA1* se caracterizó por ser un factor de transcripción específico de simbiosis que desempeña una función clave durante el desarrollo de nódulos mediante el control de la persistencia del meristema (Combier et al., 2006). La expresión del gen *MtNF-YA1* se encuentra limitada espacialmente a la zona meristemática de los nódulos indeterminados mediante un mecanismo de regulación post-transcripcional mediado por un RNA pequeño, el microRNA miRNA169. Recientemente, se ha demostrado que existe una alta expresión de *MtNF-YA1* en etapas tempranas de las interacción simbiótica, particularmente en los pelos radicales

de la zona de infección (Laporte et al., 2014). En este trabajo, los autores mostraron que plantas mutantes que llevan un codón de terminación prematuro en este gen forman IT aberrantes (gruesos y ramificados) que no progresan hacia las células corticales. También se demostró que MtNF-YA1 presenta redundancia de función con MtNF-YA2 durante la infección del rizobio (Laloum et al., 2014). Por otro lado, Soyano et al. describieron que el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, o *knockdown*) de *LjNF-YA1* inhibe la organogénesis del nódulo, pero no afecta el proceso de infección en *L. japonicus* (Soyano et al., 2013). En este trabajo también demostraron que NIN es un regulador directo de los genes *LjNF-YA1* y *LjNF-YB1*. Más recientemente, se ha demostrado que CYCLOPS es fosforilada por la proteína quinasa CCaMK, exponiendo su dominio de unión al DNA. En esta conformación, CYCLOPS puede reconocer y unirse a una región específica del promotor de *NIN*, iniciando una cascada transcripcional que involucra a NF-YA1 y conduce a la formación de nódulos (Singh et al., 2014).

Estudios de genética reversa realizados en *P. vulgaris* en nuestro laboratorio, revelaron que la subunidad PvNF-YC1 es requerida tanto para la organogénesis de nódulos como para la infección (Zanetti et al., 2010; Mazziotta et al., 2012). Se generaron plantas del cultivar mesoamericano con raíces transgénicas que expresan un RNA de interferencia (RNAi) específico para *PvNF-YC1*. Cinéticas de nodulación utilizando cepas de *R. etli* de diferentes eficiencia de nodulación mostraron que las plantas silenciadas en *PvNF-YC1* forman un menor número de nódulos respecto al control (Figura 7A). Las plantas silenciadas en *PvNF-YC1* mostraron un tamaño reducido y síntomas de deficiencia de nitrógeno respecto a las plantas control. Sumado a esto, se observó que los nódulos formados en las raíces silenciadas son de menor tamaño que los controles y de color blanquecino (Figura 7B). Otros efectos del silenciamiento de *PvNF-YC1* son un aumento en el número de pelos radicales deformados en respuesta al rizobio y una reducción en la formación y progresión de los ITs (Figura 7C, D).

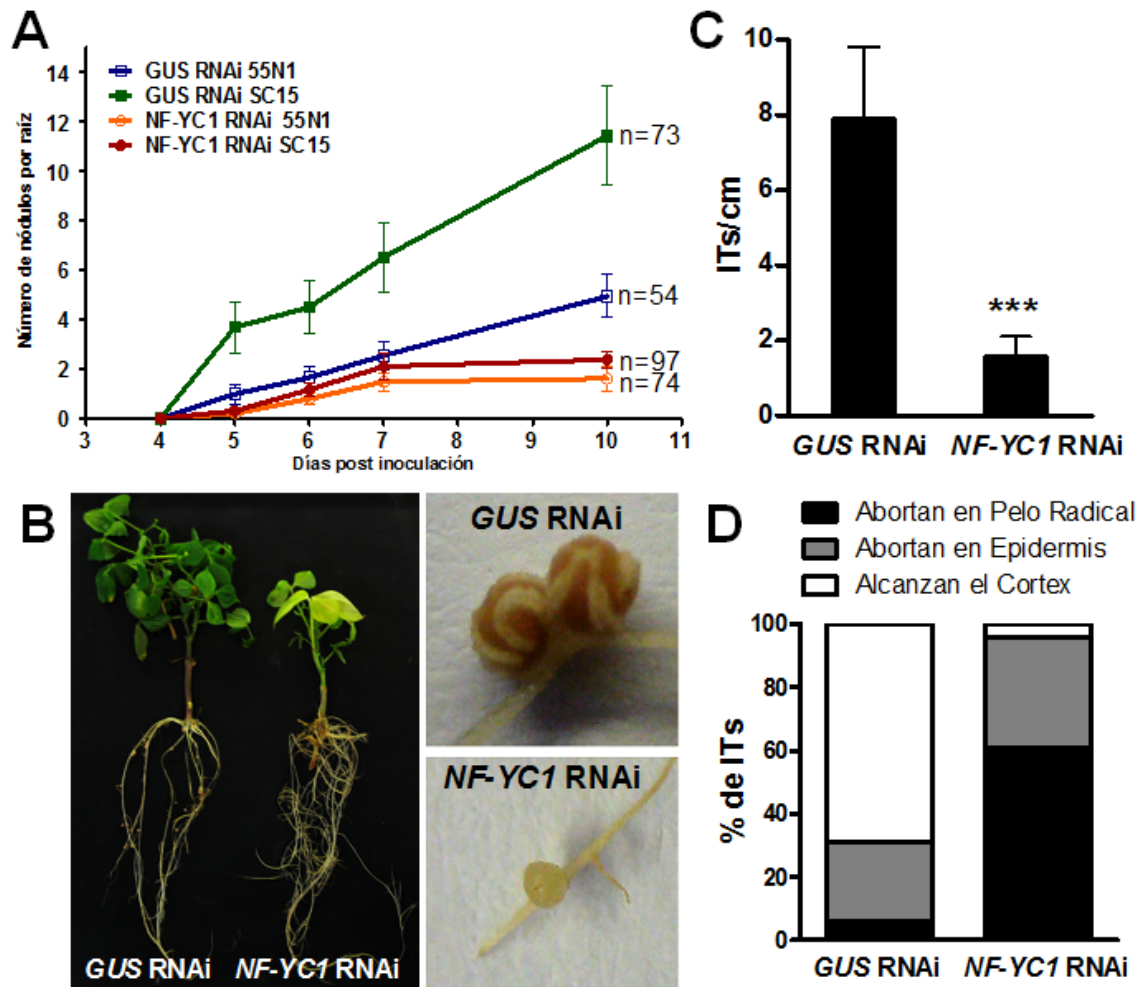


Figura 7: Fenotipo observado en las plantas de poroto *PvNF-YC1* RNAi

A. Cinética de nodulación de plantas control *GUS* RNAi y plantas *PvNF-YC1* RNAi inoculadas con cepas de *R. etli* SC15 (más eficiente) y 55N1 (menos eficiente).

B. Fenotipo de las plantas *GUS* (izquierda) y *PvNF-YC1* RNAi (derecha) a los 21 días luego de la inoculación con *R. etli* SC15. Estas plantas, que desarrollaron un promedio de 2 nódulos por raíz, muestran síntomas típicos de deficiencia de nitrógeno como poco desarrollo foliar y clorosis respecto de las plantas control, las cuales desarrollaron un promedio de 12 nódulos por raíz. A la derecha se muestran nódulos desarrollados en plantas control *GUS* y *PvNF-YC1* RNAi.

C. Número de ITs formados por centímetro de raíz en plantas control y plantas *PvNF-YC1* RNAi. Los asteriscos indican que el valor en las raíces de *PvNF-YC1* RNAi fue significativamente diferente al de las raíces *GUS* RNAi en *t*-test con $P < 0,001$ ($n > 50$).

D. Porcentaje de ITs que abortan en pelos radicales, en epidermis o que progresan hasta las células corticales de plantas control o *PvNF-YC1* RNAi.

Adaptado de Zanetti et al (2010).

El aumento en los niveles de *PvNF-YC1* mediante su expresión bajo un promotor fuerte y constitutivo es suficiente para mejorar la nodulación por las cepas menos eficientes (Figura 8A y 8B), posiblemente a través de la activación de los genes del ciclo celular responsables de la transición de la fase G2 a M. Ensayos de competencia mostraron que las plantas que sobreexpresan *PvNF-YC1* tienen un mayor porcentaje de

ocupación por la cepa menos eficiente y competitiva (Figura 8C). Esto indica que la sobreexpresión de PvNF-YC1 es suficiente para disminuir notablemente la selectividad de la planta frente a las distintas cepas de rizobio, permitiendo que las menos competitivas logren ocupar el nódulo (Zanetti et al., 2010).

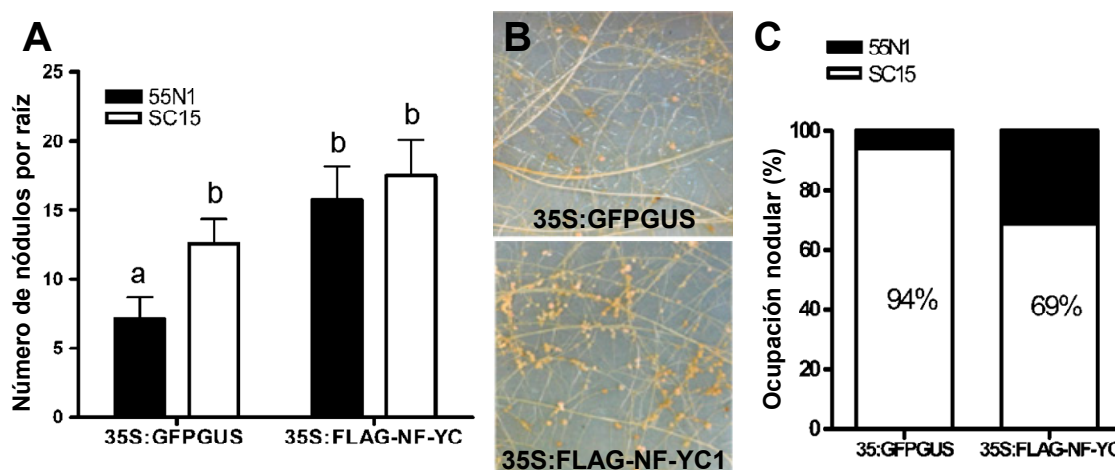


Figura 8. Fenotipo de sobreexpresión de PvNF-YC1

A. Número de nódulos desarrollados en plantas control (35S:GFPUS) y en plantas que sobreexpresan PvNF-YC1 (35S:FLAG-NF-YC1) a los 10 días luego de la inoculación con las cepas SC15 o 55N1.

B. Imágenes representativas que ilustran la mayor densidad de nódulos presentes en plantas que sobreexpresan PvNF-YC1 (panel inferior) en comparación con plantas control 35S:GFPUS (panel superior) a los 21 dpi con la cepa de *R. etli* menos eficiente 55N1.

C. Ensayo de coinoculación y determinación del porcentaje de ocupación por cada cepa. Se coinoculó con una mezcla de SC15 y 55N1 y se determinó la cepa presente en cada nódulo a partir del polimorfismo del gen *nodC*. Adaptado de Zanetti et al (2010).

8. Factores de transcripción GRAS

Los factores de transcripción de tipo GRAS constituyen una importante familia de proteínas específicas de plantas, con un mínimo de 33 y 60 miembros en *Arabidopsis* y arroz, respectivamente. Sus iniciales provienen de los tres miembros inicialmente identificados: *GIBBERELLIC-ACID INSENSITIVE* (GAI), *REPRESSOR OF GAI* (RGA) y *SCARECROW* (SCR) (Pysh et al., 1999; Tian et al., 2004; Lee et al., 2008). Estas proteínas han sido caracterizadas como reguladores transcripcionales y muestran alta similitud de secuencia en sus regiones C-terminales. Esta región está compuesta de cinco dominios: dos repeticiones ricas en Leucina flanqueando un dominio VHIID, un

dominio PFYRE que procede al segundo dominio rico en Leu, y una dominio C-terminal SAW (Pysh et al., 1999; Bolle, 2004; Tian et al., 2004).

Las proteínas de la familia GRAS poseen diversas funciones en el desarrollo del tallo y la raíz, y en las vías de transducción de señales controladas por los fitocromos A y B (Bolle, 2004). En leguminosas se identificaron dos proteínas de esta familia que son requeridas para la nodulación, NSP1 y NSP2 (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Heckmann et al., 2006). Estos factores de transcripción median diferentes respuestas inducidas por el NF, como la deformación de pelos radicales, formación del IT, las divisiones de las células corticales y la expresión de nodulinas (Catoira, 2000; Oldroyd and Long, 2003; Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005). Curiosamente, NSP1 y NSP2 pueden formar homo y heterodímeros y se asocian a los promotores de ciertas nodulinas tempranas (Hirsch et al., 2009). El complejo formado por NSP1 y NSP2 es necesario para la actividad de ERN como regulador transcripcional de la nodulina ENOD11 durante la progresión de la infección por rizobios (Cerri et al., 2012). Ambas proteínas también están involucradas en la micorrización, una interacción simbiótica con hongos que está presente en la mayoría de las plantas terrestres y que permite la incorporación de fósforo desde la rizósfera (Liu et al., 2011). Recientemente, se ha identificado otra proteína GRAS, denominada RAM1 (Required for Arbuscular Mycorrhization), que desempeña una función específica en la formación de micorrizas arbusculares a través de su interacción con NSP2 (Gobbato et al., 2012).

8.1. Identificación de un factor de transcripción tipo GRAS de poroto

Con el objetivo de identificar proteínas que formen parte del mismo complejo transcripcional que PvNF-YC1, la Dr. Marina Battaglia (ex miembro del laboratorio) llevó a cabo un *screening* de una biblioteca de doble híbrido de levadura. La biblioteca fue construida a partir de cDNA sintetizado sobre mRNA de plantas de poroto

mesoamericano NAG12 inoculadas con la cepa SC15 por 24 h (Battaglia et al., 2014). Se obtuvieron 45 clones, correspondientes a 8 cDNAs no redundantes, dos de los cuales mostraron alta similitud de secuencia con una proteína GRAS según una búsqueda BLASTX contra la base de datos no redundante de GenBank. Una búsqueda contra el genoma de *P. vulgaris* mostró que el gen con mayor identidad de secuencia se localiza en el cromosoma 3 (Gene ID: Phvul.003G085000). La proteína predicha contiene 549 aminoácidos, con una masa molecular de 61,2 kDa y un pI de 10,8. El único dominio conservado es el GRAS en el extremo C-terminal, donde los motivos y aminoácidos característicos están altamente conservados (Battaglia et al., 2014).

La familia GRAS de *A. thaliana* está compuesta por 32 miembros, divididos en 8 subfamilias que presentan funciones y dominios conservados (Tian et al., 2004). Un análisis filogenético de las secuencias de Arabidopsis y *P. vulgaris* mostró que la proteína codificada por Phvul.003G085000 pertenece a la subfamilia Phytochrome A Signal Transduction1 (PAT1) y presenta mayor similitud de secuencia con SCL13 (*Scarecrow like 13*) de Arabidopsis (Figura 9A). SCL13 ha sido involucrado en respuestas a la luz mediadas por los fitocromos A y B, pero también presenta altos niveles de expresión en las raíces de Arabidopsis (Torres-Galea et al., 2006). Sobre la base de este análisis y de los resultados obtenidos en el Capítulo III de esta tesis, se denominó al gen Phvul.003G085000 como *SIN1*, por SCL13 Involved in Nodulation (Battaglia et al., 2014). Un análisis filogenético de la rama SCL13, incluyendo los mejores homólogos de AtSCL13 de *P. vulgaris*, *M. truncatula* y *L. japonicus*, se muestra en la Figura 9B.

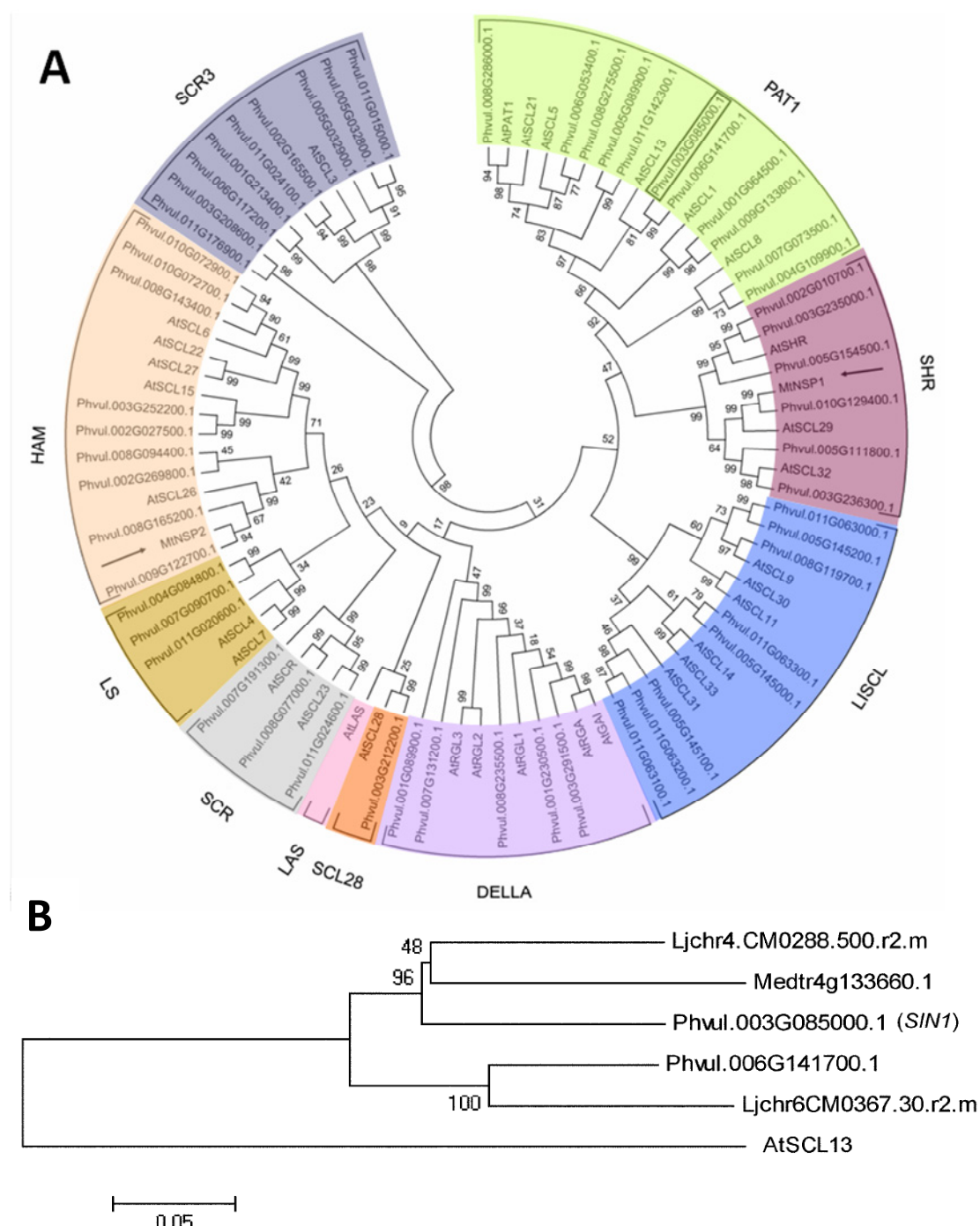


Figura 9. Análisis filogenético de la familia GRAS de *P. vulgaris*.

A. Análisis filogenético de la familia GRAS de *P. vulgaris* y *Arabidopsis* sobre la base de la clasificación en subfamilias realizadas por Bolle (2004) y Pysh et al. (1999). La posición de SIN1 (Phvul.003G085000) se indica mediante un rectángulo. NSP1 y NSP2 de *M. truncatula* se indican con flechas. El filograma se construyó utilizando el método de *neighbor-joining* basado en un análisis de alineamiento múltiple de secuencias. El árbol filogenético fue generado usando MEGA5 de un análisis ClustalW. Los números presentes en cada rama representan valores de *bootstrap* (10000 repeticiones).

B. AtSCL13 y sus homólogos de *P. vulgaris*, *M. truncatula* y *L. japonicus*.

Adaptado de Battaglia et al (2014).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Objetivo general e hipótesis de trabajo

La FBN llevada a cabo por los rizobios en la asociación simbiótica con leguminosas permite la incorporación de nitrógeno al suelo para su explotación en sistemas agropecuarios a muy bajo costo. La ventaja de la FBN por sobre los fertilizantes nitrogenados es que, al ser un recurso natural, no provoca efectos perjudiciales en el medio ambiente.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio indican que existen determinantes moleculares en la planta que afectan la preferencia del poroto por ciertos rizobios del mismo centro geográfico. Esta preferencia tiene consecuencias importantes en la eficiencia del proceso de fijación de nitrógeno, ya que determina las cepas del suelo que son seleccionadas por la planta. En la actualidad se utilizan como inoculantes cepas que resultan eficientes en la FBN, pero que son desplazadas por otras bacterias presentes en los suelos que exhiben mayor afinidad por la planta hospedante.

Como se mencionó en la introducción, los estudios genéticos llevados a cabo en las leguminosas modelo (*M. truncatula* y *L. japonicus*) han sido muy exitosos en la identificación de genes involucrados en distintas etapas de la simbiosis y han permitido caracterizar un importante número de genes que participan de la vía de señalización que desencadena el programa morfogénico de la nodulación. Sin embargo, se requiere la identificación de otros componentes adicionales para enriquecer el conocimiento sobre esta vía, y dilucidar los mecanismos por los cuales la planta selecciona aquellas cepas más eficiente. La redundancia de función observada para ciertos genes que forman parte de familias génicas (especialmente aquellos que codifican factores de transcripción) atentan contra la identificación de nuevos componentes de esta vía utilizando aproximaciones derivadas de la genética directa.

La hipótesis general de este trabajo de tesis postula que los factores de transcripción NF-Y y SIN1 participan activamente en la regulación de la expresión génica en las

plantas leguminosas, tanto durante el desarrollo del sistema radical como en la asociación con sus pares simbióticos.

El objetivo general del presente trabajo es profundizar el conocimiento de las bases moleculares de la asociación preferencial entre leguminosas y rizobios. Este conocimiento proveerá de bases racionales para la selección de cepas inoculantes que sean altamente eficientes y a la vez buenas competidoras con las bacterias presentes en el suelo.

Objetivos específicos

El estudio funcional de *PvNF-YC1* permitió demostrar su participación en la respuesta selectiva de *P. vulgaris* frente a cepas de *R. etli* provenientes de diferentes centros de diversificación (Zanetti et al., 2010). Con el objeto de caracterizar nuevos componentes de la vía de señalización intracelular en la que el producto de este gen participa, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Caracterizar las familias génicas de las subunidades NF-YA, NF-YB y NF-YC del factor heterotrimérico NF-Y durante la asociación *P. vulgaris*- *R. etli* e identificar aquellos que se expresen específicamente en nódulos o en respuesta a la infección por *R. etli*.
- 2- Investigar mediante genética reversa la función del gen *PvNF-YA1* en el establecimiento de la simbiosis y en particular su función en la respuesta selectiva de *P. vulgaris* frente a cepas más eficientes.
- 3- Evaluar la función del gen *SIN1*, cuyo producto proteico interacciona físicamente con *PvNF-YC1*, en el crecimiento y desarrollo de la raíz y durante la simbiosis nodular en *P. vulgaris*.

CAPÍTULO I

Resultados y discusión

Capítulo I. Caracterización de los factores heterotriméricos NF-Y de *Phaseolus vulgaris* durante su asociación con *Rhizobium etli*.

1. Identificación, anotación y análisis de los NF-Ys de *P. vulgaris*

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados en la introducción sobre la función de PvNF-YC1 en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli*, el primer objetivo fue realizar un análisis a escala genómica de las familias génicas que codifican las subunidades A, B y C de los factores de transcripción NF-Y. A partir de las secuencias completas de aminoácidos de los 30 miembros de la familia de genes NF-Y descritos en Arabidopsis (Petroni et al., 2012) se realizó una búsqueda utilizando el algoritmo BLASTX y la versión 1.0 del genoma de *P. vulgaris* (disponible públicamente en <http://phytozome.jgi.doe.gov>). Tomando sólo aquellas secuencias con un valor de $e < 10^{-5}$, se identificaron 9 genes de la familia NF-YA, 14 de la familia NF-YB y 7 de la familia NF-YC (Tabla 1). Teniendo en cuenta la nomenclatura recomendada para las familias NF-Y de plantas (Laloum et al., 2013), designamos a cada miembro con un código de dos letras correspondiente a las iniciales de la especie (Pv para *P. vulgaris*), seguido de NF-Y y la letra correspondiente a cada subunidad (A, B o C) y finalmente por un número para cada miembro. Debido a que no existe una caracterización previa de algún miembro de la familia NF-YB en *P. vulgaris*, no hubo restricciones para la numeración de los miembros de esta familia. En los casos de las familias de NF-YA y NF-YC, PvNF-YA1 y PvNF-YC1, -YC2 y -YC3 fueron caracterizadas anteriormente (Zanetti et al., 2010; Battaglia et al., 2014), por lo que continuamos con la numeración correlativa de estos genes. La Tabla 1 presenta la información de cada miembro de la

familia con sus nombres, el identificador génico de *P. vulgaris* y su mejor homólogo/ortólogo putativo en *A. thaliana* y en otras dos especies de leguminosas (*M. truncatula* y *Glycine max*).

Tabla 1. Anotación de las familias NF-Y de *P. vulgaris*. Homólogo/ortólogo putativo para cada miembro PvNF-Y en *M. truncatula*, *A. thaliana* y *G. max*.

Nombre	Identificador génico	Ortólogos		
		<i>M. truncatula</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>G. max</i>
PvNF-YA1	Phvul.001G196800	MtNF-YA2 (Medtr7g106450)	AtNF-YA10 (AT5G06510)	GmNF-YA10 (Glyma.19G200800)
PvNF-YA2	Phvul.002G246600	MtNF-YA6 (Medtr2g030170)	AtNF-YA7 (AT1G30500)	GmNF-YA7 (Glyma.08G124200)
PvNF-YA3	Phvul.005G156100	MtNF-YA4 (Medtr2g099490)	AtNF-YA8 (AT1G17590)	GmNF-YA8 (Glyma.15G027400)
PvNF-YA4	Phvul.003G133100	MtNF-YA3 (Medtr2g041090)	AtNF-YA3 (AT1G72830)	GmNF-YA3 (Glyma.13G107900)
PvNF-YA5	Phvul.008G283100	MtNF-YA5 (Medtr3g061510)	AtNF-YA9 (AT3G20910)	GmNF-YA9 (Glyma.02G303800)
PvNF-YA6	Phvul.011G211300	MtNF-YA7 (Medtr8g037270)	AtNF-YA9 (AT3G20910)	GmNF-YA9 (Glyma.13G202300)
PvNF-YA7	Phvul.006G062200	MtNF-YA5 (Medtr3g061510)	AtNF-YA1 (AT5G12840)	GmNF-YA1 (Glyma.18G071000)
PvNF-YA8	Phvul.010G133300	MtNF-YA8 (Medtr8g019540)	AtNF-YA3 (AT1G72830)	GmNF-YA3 (Glyma.07G036200)
PvNF-YA9	Phvul.007G267100	MtNF-YA1 (Medtr1g056530)	AtNF-YA10 (AT5G06510)	GmNF-YA10 (Glyma.02G195000)
PvNF-YB1	Phvul.008G278900	MtNF-YB17 (Medtr5g095740)	AtNF-YB3 (AT4G14540)	GmNF-YB3 (Glyma.18G077500)
PvNF-YB2	Phvul.007G134000	MtNF-YB9 (Medtr1g072790)	AtNF-YB8 (AT2G37060)	GmNF-YB8 (Glyma.20G198500)
PvNF-YB3	Phvul.006G139400	MtNF-YB13 (Medtr2g026710)	AtNF-YB3 (AT4G14540)	GmNF-YB3 (Glyma.15G118800)
PvNF-YB4	Phvul.002G264300	MtNF-YB7 (Medtr8g091720)	AtNF-YB3 (AT4G14540)	GmNF-YB3 (Glyma.05G183200)
PvNF-YB5	Phvul.007G163100	MtNF-YB2 (Medtr7g100650)	AtNF-YB10 (AT3G53340)	GmNF-YB10 (Glyma.03G177700)
PvNF-YB6	Phvul.007G165100	MtNF-YB6 (Medtr1g088860)	AtNF-YB5 (AT2G47810)	GmNF-YB5 (Glyma.10G020100)
PvNF-YB7	Phvul.003G086800	MtNF-YB13 (Medtr2g026710)	AtNF-YB3 (AT4G14540)	GmNF-YB3 (Glyma.09G014100)
PvNF-YB8	Phvul.002G273800	MtNF-YB15 (Medtr8g093920)	AtNF-YB7 (AT2G13570)	GmNF-YB7 (Glyma.08G001300)
PvNF-YB9	Phvul.009G155500	MtNF-YB15 (Medtr8g093920)	AtNF-YB7 (AT2G13570)	GmNF-YB7 (Glyma.08G001300)
PvNF-YB10	Phvul.009G246400	MtNF-YB18 (Medtr4g119500)	AtNF-YB5 (AT2G47810)	GmNF-YB5 (Glyma.09G046200)
PvNF-YB11	Phvul.003G103500	MtNF-YB18 (Medtr4g119500)	AtNF-YB5 (AT2G47810)	GmNF-YB5 (Glyma.17G025300)
PvNF-YB12	Phvul.007G234800	MtNF-YB10 (Medtr1g039040)	AtNF-YB6 (AT5G47670)	GmNF-YB6 (Glyma.20G000600)
PvNF-YB13	Phvul.007G195900	MtNF-YB11 (Medtr1g083070)	AtNF-YB4 (AT1G09030)	GmNF-YB4 (Glyma.20G234900)
PvNF-YB14	Phvul.001G174600	MtNF-YB3 (Medtr7g061270)	AtNF-YB10 (AT3G53340)	GmNF-YB10 (Glyma.03G177700)
PvNF-YC1	Phvul.006G093200	MtNF-YC2 (Medtr7g113680)	AtNF-YC9 (AT1G08970)	GmNF-YC9 (Glyma.19G236400)
PvNF-YC2	Phvul.005G050000	MtNF-YC2 (Medtr7g113680)	AtNF-YC2 (AT1G56170)	GmNF-YC2 (Glyma.15G261300)
PvNF-YC3	Phvul.010G102300	MtNF-YC6 (Medtr2g081600)	AtNF-YC4 (AT5G63470)	GmNF-YC1 (Glyma.13G284000)
PvNF-YC4	Phvul.009G166000	MtNF-YC3 (Medtr3g099180)	AtNF-YC1 (AT3G48590)	GmNF-YC1 (Glyma.06G169600)
PvNF-YC5	Phvul.006G152400	MtNF-YC2 (Medtr7g113680)	AtNF-YC2 (AT1G56170)	GmNF-YC9 (Glyma.08G148200)
PvNF-YC6	Phvul.007G181400	MtNF-YC2 (Medtr7g113680)	AtNF-YC9 (AT1G08970)	GmNF-YC9 (Glyma.20G232400)
PvNF-YC7	Phvul.010G082500	MtNF-YC6 (Medtr2g081600)	AtNF-YC3 (AT1G54830)	GmNF-YC1 (Glyma.13G284000)

Posteriormente establecimos la posición física de los 30 miembros PvNF-Y en los cromosomas de *P. vulgaris* mediante la función Map-View del sitio Plant Genome Duplication Database (PGDD). Este análisis reveló que estos genes se encuentran distribuidos en 10 de los 11 cromosomas de *P. vulgaris* (Figura 10). En particular, los 9 miembros de la familia PvNF-YA se encuentran distribuidos uniformemente en 9 cromosomas, mientras que los miembros de la familia PvNF-YB mostraron un mayor grado de asociación, con cinco miembros situados en el cromosoma Chr07. Por otro lado, los miembros de la familia PvNF-YC se ubican en sólo 5 cromosomas, con uno o dos genes por cromosoma.

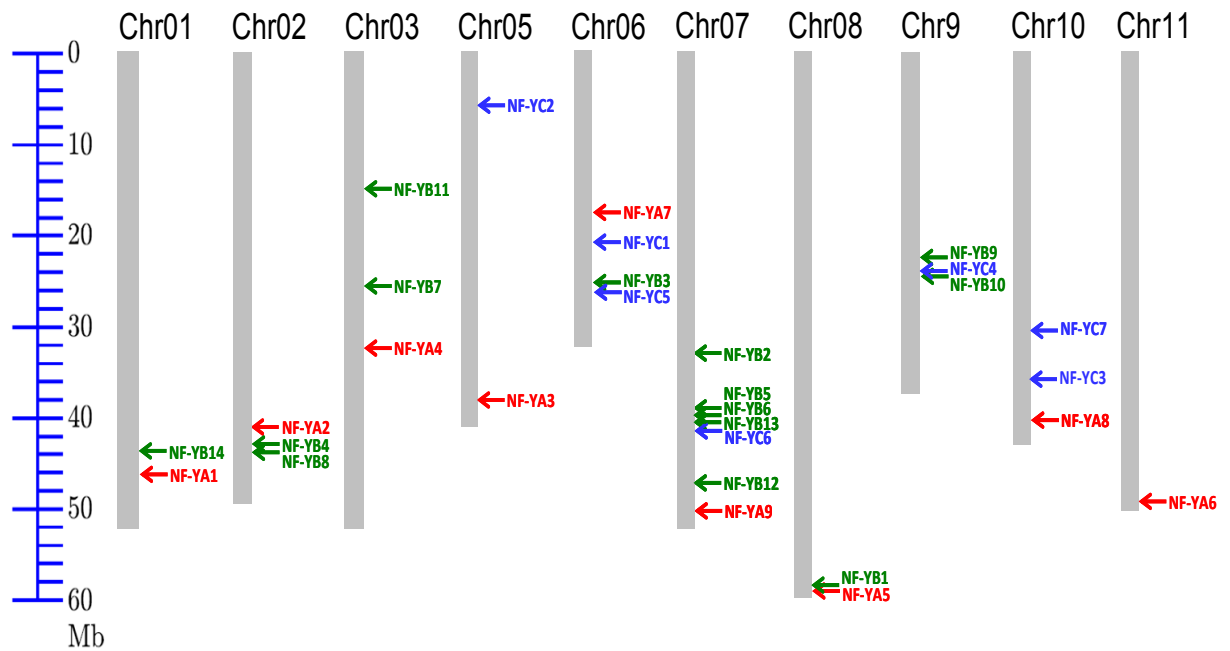


Figura 10. Localización cromosómica de los genes PvNF-Ys. La posición cromosómica de cada miembro de la familia PvNF-YA (rojo), PvNF-YB (verde) y PvNF-YC (azul) fue asignada al genoma de *P. vulgaris* mediante la función Map-View de Plant Genome Duplication Database (PGDD). El número de cromosoma se indica en la parte superior. A la izquierda se indica la escala en megabases (Mb).

1.1 Estructura génica de los PvNF-Ys

A partir de los modelos génicos y datos de secuenciación masiva disponibles en la base de datos genómica de *P. vulgaris* (<http://phytozome.jgi.doe.gov>) pudimos predecir la estructura génica de cada uno de los miembros de la familia NF-Y. El análisis de la estructura génica de la familia PvNF-YA reveló que sus miembros poseen una compleja organización, con 5 a 7 intrones por gen distribuidos principalmente a lo largo de las regiones 5' no traducidas (UTR, *UnTranslated Regions*) y las regiones codificantes, siendo *PvNF-YA6* el único miembro con un intrón en la región 3' UTR (Figura 11A). En contraste con lo observado en la familia PvNF-YA, los genes de la familia PvNF-YB son menos estructurados, mostrando una organización de intrones y exones variable entre los diferentes miembros (Figura 11B). Se detectaron intrones en 5 de los 14 miembros de esta familia, siendo *PvNF-YB2* y *-YB5* los genes más estructurados con 6 intrones cada uno, seguidos por *PvNF-YB14* con 4 y *PvNF-YB10* e *-YB11* con sólo 1 intrón. Estos intrones se distribuyen a lo largo de la región 5' UTR y la región codificante de estos genes. Por otro lado, el análisis de la familia PvNF-YC reveló que 4 de los 7 miembros (*PvNF-YC1*, *-YC2*, *-YC4* o *-YC6*) contienen al menos un intrón. *PvNF-YC1* contiene 3 intrones, 2 de ellos en la región 5' UTR y el tercero en el 3' UTR. En el caso de *PvNF-YC2* e *-YC6*, se detectaron intrones exclusivamente en la región 5' UTR, mientras que el único intrón detectado en *PvNF-YC4* se encuentra en la región codificante (Figura 11C). En el caso de *PvNF-YC7*, no encontramos regiones 5' o 3' UTR en los modelos génicos que se proponen en la versión actual del genoma de *P. vulgaris* ni tampoco en las secuencias de la base de datos de *Expressed Sequences Tags* (EST) disponibles en el *GeneBank*.

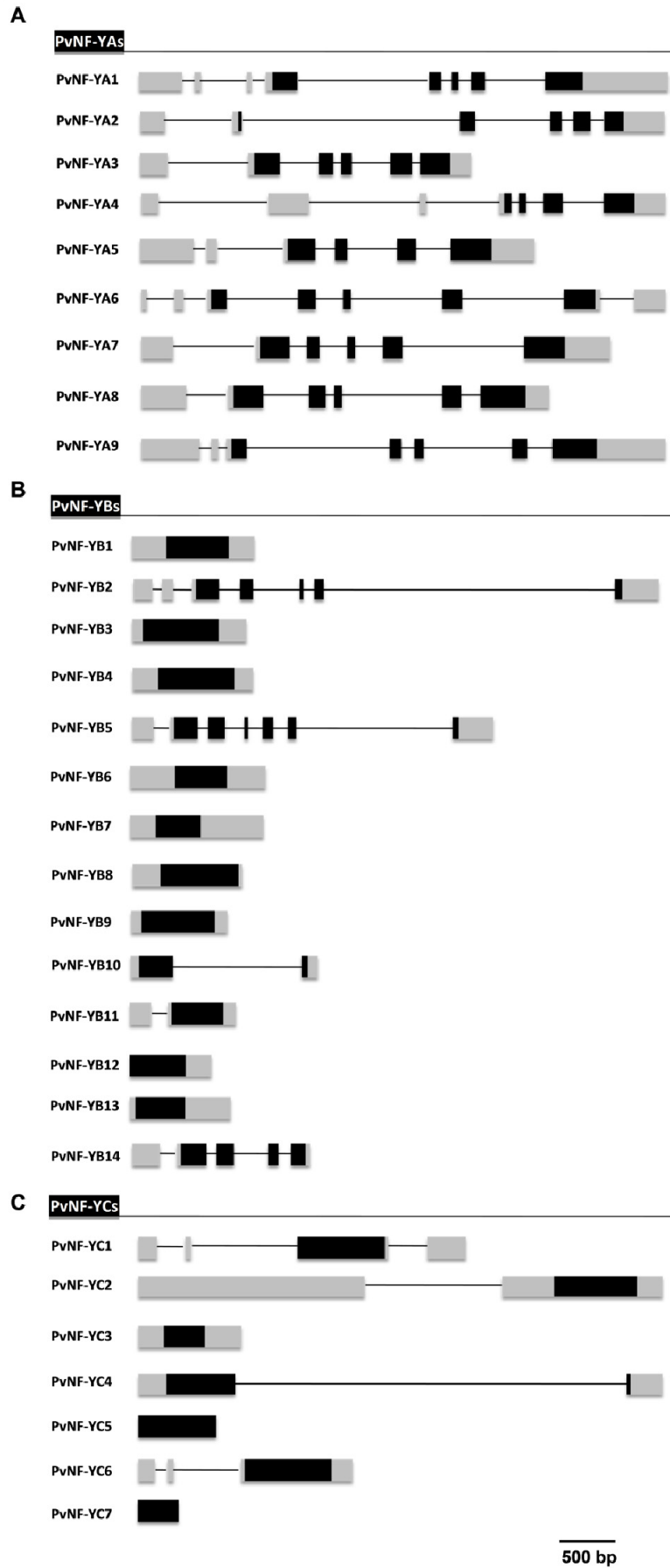


Figura 11. Estructura génica de los miembros de las familias que codifican las subunidades PvNF-Y de *P. vulgaris*.

Esquema de la organización de intrones y exones de los miembros de las familias PvNF-YA (A), PvNF-YB (B) y PvNF-YC (C) predichas a partir de los modelos de genes y los estudios de RNA seq disponibles en la base de datos del genoma de *P. vulgaris* V1.0. Las líneas representan los intrones y los rectángulos representan los exones. Los cuadros grises corresponden a regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) y los negros corresponden a las regiones codificantes (CDS). La escala corresponde a 500 pb. *PvNF-YB12* no posee un 5' UTR anotado en el genoma de *P. vulgaris*. Del mismo modo, *PvNF-YC5* y *-YC7* no tienen 5' o 3' UTR anotados hasta el momento.

1.2 Identificación de uORFs en los PvNF-YAs

Entre los diversos elementos *cis* presentes en los mRNAs que participan en la regulación de la traducción están los codones AUG presentes dentro de la secuencia 5' UTR líder del mensajero (referidos como *upstream* AUGs) y, en algunos casos, asociados a *upstream Open Reading Frames* (uORFs). El modo de acción mejor estudiado de los uORFs consiste en la inhibición de la traducción a través de un mecanismo llamado “estancamiento de ribosomas”. En este caso, el ribosoma queda detenido durante la fase de elongación o de terminación de la traducción del uORF, bloqueando así la traducción del ORF principal (Morris and Geballe, 2000).

Un estudio llevado a cabo en *M. truncatula* mostró que el gen *MtNF-YA1* (originalmente nombrado como *MtHAP2-1*) experimenta un mecanismo de regulación post-transcripcional que involucra un péptido corto que desestabiliza el transcripto *MtNF-YA1*. Este péptido (uORF1p) está codificado por un uORF que se genera por una variante de *splicing* alternativo de *MtNF-YA1* que retiene un intrón de 900 pb en la región 5' UTR (Combier et al., 2008). Curiosamente y en contraste con lo descrito anteriormente acerca de la regulación en *cis* de los uORFs, uORF1p es capaz de actuar en *trans* para regular la expresión génica de *MtNF-YA1*.

La presencia de intrones en las regiones 5' UTR de todos los miembros NF-YA de *P. vulgaris* llevó a investigar si existía algún uORF codificado dentro de la secuencia 5' UTR cuando estos intrones son retenidos. Haciendo uso del programa VectorNTI, se identificaron uORFs (≥ 60 nt) en 5 de los 9 genes *PvNF-YA*. *PvNF-YA1* e *-YA2* contienen 2 uORFs, *PvNF-YA4* contiene 4 uORFs y *PvNF-YA8* e *-YA9* contienen sólo 1 uORF cuando los intrones presentes en el 5' UTR son retenidos (Figura 12).

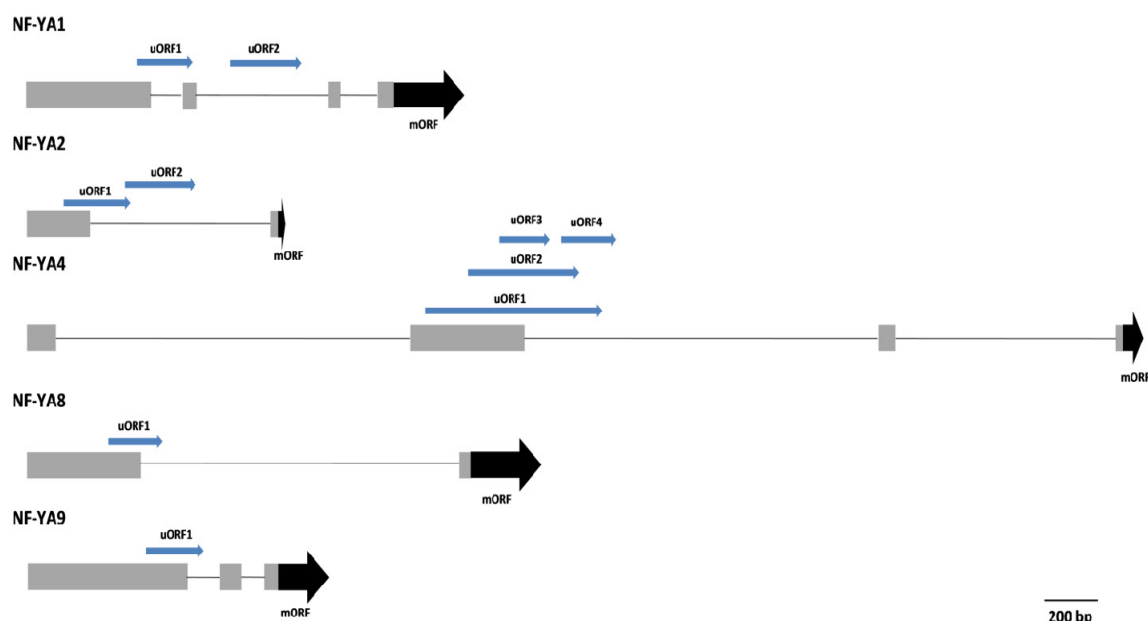


Figura 12. Presencia de uORFs en los miembros de la familia PvNF-YA.

Representación de los marcos abiertos de lectura principales (mORFs) y ubicados aguas arriba (uORFs) de los miembros individuales de la subunidad PvNF-YA. El análisis se realizó con el programa VectorNTI Advance 10 utilizando un tamaño de ORF ≥ 60 nucleótidos (nt). Las líneas representan los intrones, las cajas grises representan 5' UTRs, las flechas negras representan los mORFs y las flechas azules representan uORFs presentes cuando se retiene algún intrón. La escala corresponde a 200 bases (bp).

2. Alineamientos múltiples y análisis filogenético de las familias

PvNF-Y

Con el objetivo de estudiar la estructura proteica de las diferentes familias PvNF-Ys se construyeron alineamientos múltiples utilizando ClustalW (Thompson et al., 1994). Como se ha descrito previamente en otras especies de plantas, las proteínas de cada familia PvNF-Y muestran una región central de extensa homología flanqueada por secuencias no conservadas (Figura S1, S2 y S3) (Siefers et al., 2009). De acuerdo a estudios realizados en levaduras y mamíferos, esta región central contiene los dominios conservados necesarios para las interacciones con las otras subunidades y con el DNA (Xing et al., 1993; Xing et al., 1994; Kim et al., 1996; Sinha et al., 1996; McNabb et al., 1997). Los alineamientos múltiples de la Figura 13 muestran las regiones conservadas de cada familia NF-Y de *P. vulgaris* con los dominios de interacción marcados en

función de lo conocido en mamíferos y levaduras. Posteriormente, se utilizaron los alineamientos de secuencias proteicas completas de cada familia PvNF-Y para generar los árboles filogenéticos de acuerdo al método *neighbor-joining* (Figura 14).

Familia PvNF-YA. Las proteínas PvNF-YA son de longitud variable, con un rango de tamaños entre 234 y 349 aminoácidos. La región central conservada está compuesta por 53 aminoácidos y contiene dos dominios característicos con funciones separadas (Figura 13A). Estudios llevados a cabo en metazoos y levaduras indicaron que el primero de estos dominios es requerido para la interacción con las otras subunidades, mientras que el segundo dominio es importante para la unión al DNA y la especificidad de reconocimiento de secuencias CCAAT (Xing et al., 1993; Mantovani et al., 1994; Xing et al., 1994). Fuera de esta región central conservada, se observó una limitada conservación de secuencia de aminoácidos entre los diferentes miembros de esta familia (Figura S1). Estudios anteriores han demostrado que las regiones que flanquean el dominio central conservado de las proteínas NF-YA se caracterizan por la presencia de regiones ricas en glutamina (Q) y serina/ treonina (S/T), las cuales actuarían en la activación transcripcional (Cousty et al., 1996; de Silvio et al., 1999). Al igual que en otros eucariotas, el alineamiento presentado en la Figura S1 indica que las regiones que flanquean el dominio conservado de las proteínas PvNF-YA también contienen una alta composición de residuos Q y S/T; sin embargo, el número y la posición de estos residuos son variables entre los diferentes miembros de esta familia.

El árbol filogenético de la familia PvNF-YA desarrollado utilizando las secuencias completas de proteínas muestra dos clados principales, uno que contiene sólo 2 miembros y otro que contiene 7 (Figura 14A). La matriz de identidad de las proteínas completas de PvNF-YA generada por ClustalW (Tabla S1) indicó que algunos pares de proteínas presentan una identidad de aminoácidos entre sí superior a la observada con el resto de los miembros de esta familia (por ejemplo PvNF-YA5 e -YA7, PvNF-YA1 e -YA9 o PvNF-YA3 e -YA8 exhibieron 71.48%, 63.23% o 61.48% de identidad,

respectivamente). El análisis de microsintenia de la Figura S4 sustenta estas relaciones filogenéticas entre duplicados PvNF-YA. Las relaciones de sustituciones sinónimas (Ks) y no sinónimas (Ka) estimadas fueron menores a 1 para la mayoría de los duplicados PvNF-YA, sugiriendo que estos genes fueron sometidos a purificación o selección negativa.

Familia PvNF-YB. La familia PvNF-YB se compone de 14 miembros de distinta longitud (132-229 aminoácidos) que son muy similares en los 96 aminoácidos que definen el dominio central conservado, implicado en la interacción con las subunidades NF-YC y NF-YA y en la unión al DNA (Figura 13B). Este dominio conservado exhibe similitud estructural y de secuencia al dominio HFD de la histona H2B. Fuera de la región central, las secuencias de los diferentes miembros PvNF-YB son muy variables en longitud y composición de aminoácidos (Figura S2).

El árbol filogenético de la familia NF-YB de *P. vulgaris* (Figura 14B) se divide en 2 clados principales. Uno de estos clados contiene sólo 3 miembros, de los cuales 2 son idénticos en composición aminoacídica (PvNF-YB2 y -YB5). El segundo clado contiene 11 miembros, con sólo unos pocos de ellos con elevada similitud de secuencia a nivel de aminoácidos, por ejemplo, PvNF-YB8 e -YB9 y PvNF-YB10 e -YB11 con 76,78% y 80,00% de identidad, respectivamente (Tabla S2). Los resultados de microsintenia mostrados en la Figura S5 indican que los *loci* de PvNF-YB8 e -YB9, así como PvNF-YB10 e -YB11, están contenidos en grandes regiones sinténicas (Valores de e : $3e^{-150}$ y 0,0, respectivamente), reforzando las relaciones filogenéticas entre estos miembros. Estudios previos realizados en *Arabidopsis*, *Brachypodium distachyon* y arroz han mostrado que algunos miembros de NF-YB muestran una gran conservación de secuencia con los NF-YBs de metazoos, mientras que otros son más divergentes, lo que sugiere que algunos miembros de esta familia habrían sufrido una menor presión de selección, dando lugar a una evolución asimétrica de duplicados NF-YB en plantas

(Yang et al., 2005; Cao et al., 2011). Los resultados presentados en la Figura 13B indican que el proceso evolutivo habría sido similar en *P. vulgaris*.

Familia PvNF-YC. Las proteínas PvNF-YC poseen un tamaño intermedio en comparación con las PvNF-YA y PvNF-YB. La familia PvNF-YC contiene un dominio central de 80 aminoácidos altamente conservado entre los diferentes miembros y también con las secuencias de metazoos (Figura 13C). Este dominio central contiene un HFD altamente relacionado con la histona H2A. El uso de mutantes en levaduras, mamíferos y plantas confirmó la importancia de este dominio tanto para la unión al DNA como para la asociación con las otras subunidades NF-Y (Romier et al., 2003). Como ya se observó en otras especies de plantas (Siefers et al., 2009; Cao et al., 2011; Petroni et al., 2012; Baudin et al., 2015), los dominios N y C-terminales de la mayoría de las proteínas PvNF-YC se caracterizan por un enriquecimiento de residuos Q, siendo PvNF-YC3 y -YC7 las excepciones (Figura S3). A estas regiones de las proteínas NF-YC de mamíferos y levaduras se les han asignado funciones en la activación transcripcional (Coustry et al., 1996; de Silvio et al., 1999).

El árbol filogenético presentado en la Figura 14C muestra 2 clados diferentes. Uno de estos incluye 3 miembros, siendo PvNF-YC3 e -YC7 muy similares entre sí (87% de identidad); mientras que el segundo clado contiene 4 miembros, donde PvNF-YC1 e -YC6 están más estrechamente relacionados con un 86% de identidad (Tabla S3). El análisis de microsintenia de esta familia indica que los loci de PvNF-YC1 e -YC6 se encuentran contenidos en largas regiones sinténicas, lo que respalda la tan cercana relación filogenética entre este duplicado génico (Figura S6).

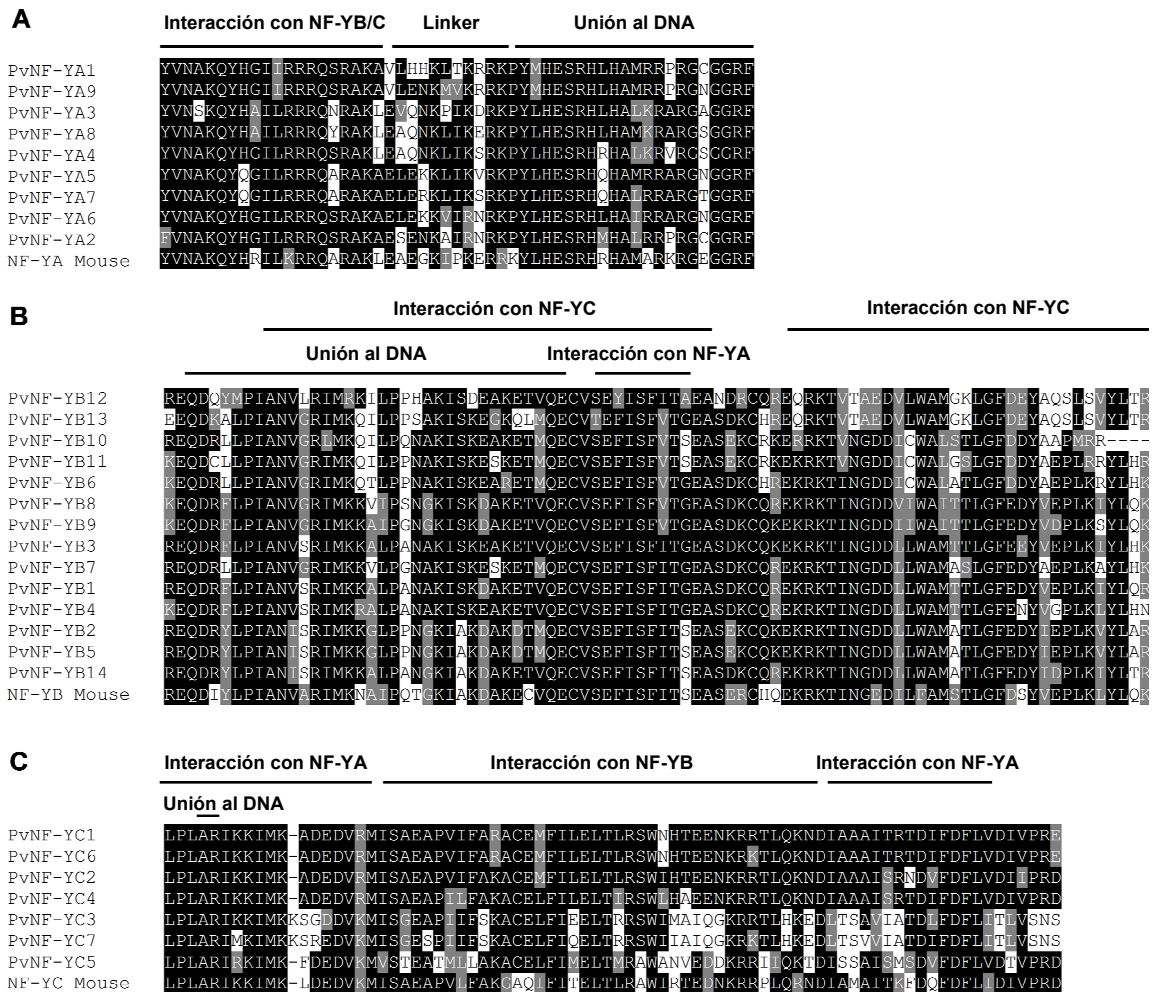


Figura 13. Alineamientos múltiples de las regiones conservadas de las familias PvNF-Y.

Alineamiento de las secuencias correspondientes a los dominios altamente conservados de las proteínas NF-YA (A), NF-YB (B) y NF-YC (C) de *P. vulgaris* (Pv) y *Mus musculus* (mouse). Los alineamientos múltiples fueron generados por ClustalW (Thompson et al., 1994) y formateados con BOXSHADE 3.21 para producir una representación gráfica del alineamiento. Los aminoácidos idénticos se destacan en cuadros negros y residuos similares se resaltan en cuadros grises. También se indican el dominio de unión al DNA y los dominios necesarios para la interacción con las otras subunidades, definidos previamente en levadura y mamíferos.

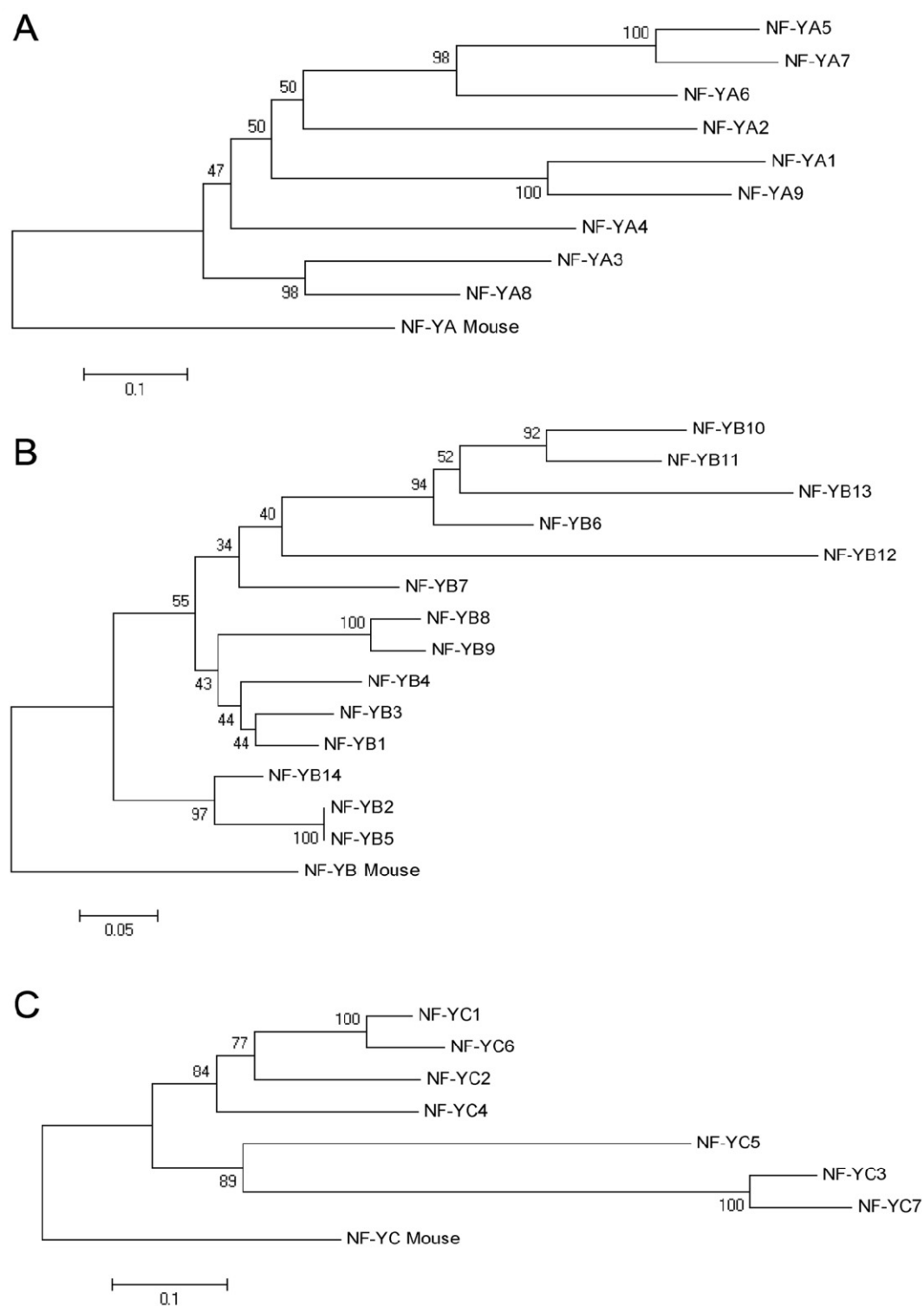


Figura 14. Árboles filogenéticos de las familias PnNF-Y.

Los árboles filogenéticos de las familias NF-YA (A), NF-YB (B) y NF-YC (C) se construyeron utilizando el método de *neighbor-joining* en base al análisis de alineamientos múltiples de las secuencias proteicas completas obtenidas de la base de datos V1.0 del genoma de poroto, incluyendo las secuencias de aminoácidos de NF-Y de ratón (mouse) como raíz. Todos los árboles fueron construidos utilizando MEGA 5 a partir de un análisis ClustalW. Los números presentes en cada rama representan valores de *bootstrap* (10000 repeticiones).

La duplicación de genes resultante de la duplicación del genoma completo o duplicaciones de genes individuales en tándem es una característica notable de los genomas de plantas (Lawton-Rauh, 2003). Para algunas categorías de genes, tales como factores de transcripción, se ha sugerido que más de 90% del aumento en el número de genes es una consecuencia de eventos de duplicación de todo el genoma (Maere et al., 2005). Por esto, los genes NF-Y resultan un buen objeto de estudio para comprender mejor la expansión y la diversificación de familias de genes de factores de transcripción en plantas. Para comparar la evolución de estas familias génicas en diferentes plantas, se realizó un análisis filogenético de la tres familias de proteínas NF-Y en cuatro genomas de plantas secuenciadas y en las cuales se han llevado a cabo varios estudios funcionales de genes NF-Y: la dicotiledónea *A. thaliana*, y tres leguminosas, *M. truncatula*, *G. max* y *P. vulgaris* (Figura 15). Debido a la alta identidad aminoacídica existente a lo largo de los miembros de las familias génicas, incluso entre diferentes especies, los valores de *bootstrap* para algunos clados son muy bajos (< 70 %); por lo tanto, estos árboles no son necesariamente precisos para realizar inferencias evolutivas. Sin embargo, estos tipos de árboles han sido útiles para vincular patrones de expresión de mRNAs en diferentes órganos con relaciones evolutivas (Gusmaroli et al., 2002; Petroni et al., 2012; Laloum et al., 2013). En este caso, el análisis se enfocó en miembros de las familias NF-Y con posibles funciones en desarrollo de órganos radicales.

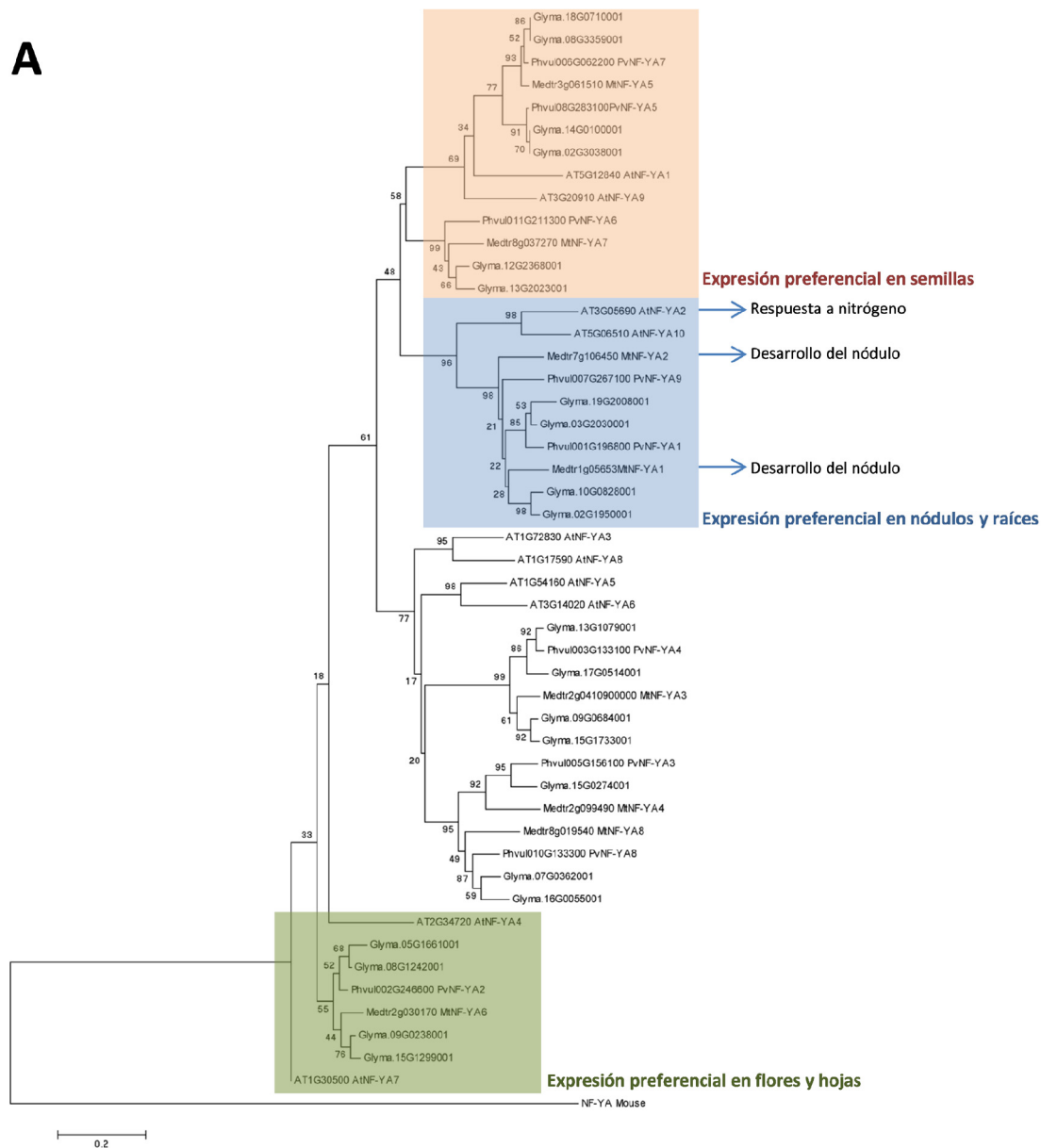
NF-YAs: La primera subunidad NF-YA reportada fue identificada en canola (*Brassica napus* L.) hace 20 años (Albani and Robert, 1995). Varios años después, se reportó que la subunidad *MtNF-YA1* de *M. truncatula* se expresa en altos niveles en nódulos desarrollados frente a la inoculación con su par simbiótico *Sinorizhobium meliloti*. Esta subunidad es requerida para el correcto desarrollo de nódulos, y junto con *MtNF-YA2* regulan etapas temprana de la simbiosis (Combiér et al., 2006; Laloum et al., 2014). Este es un ejemplo notable de la especialización de dos subunidades NF-YA que han

evolucionado para regular el desarrollo de un órgano radical que sólo está presente en las leguminosas. Curiosamente, este gen pertenece al subgrupo de leguminosas del clado remarcado en azul en la Figura 15A, que no sólo contiene genes que se expresan predominantemente en nódulos y raíces, sino también contiene la subunidad *AtNF-YA2* la cual a sido vinculada al metabolismo del nitrógeno en *Arabidopsis* (Zhao et al., 2011). Por lo tanto, se podría especular razonablemente que otros genes NF-YA de leguminosas que pertenecen a este subgrupo, también podrían desempeñar funciones en el desarrollo de nódulos o raíces.

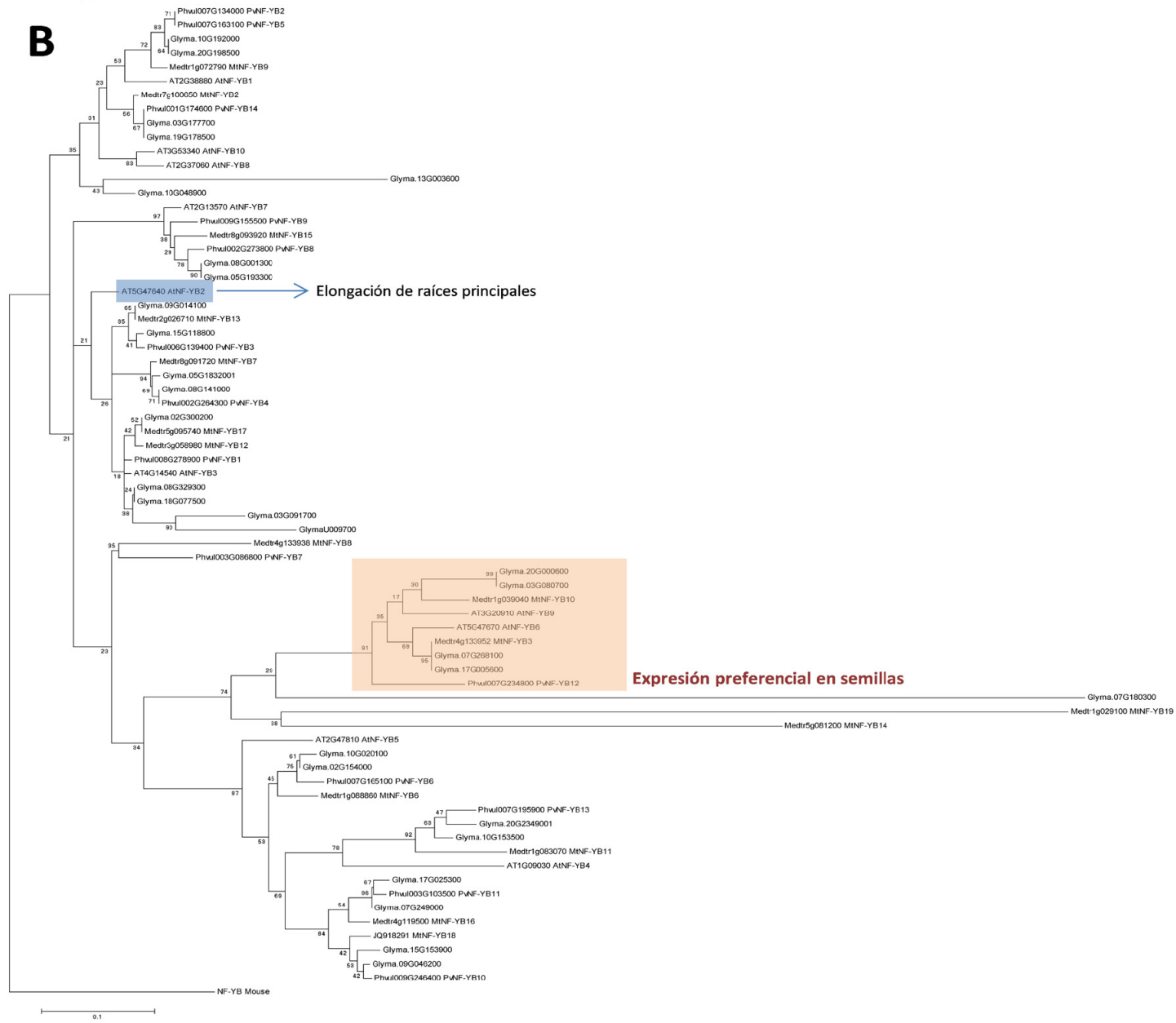
NF-YBs y NF-YCs: A diferencia de *NF-YA* no se observa una correlación clara entre los patrones de expresión y la clasificación filogenética de los genes *NF-YB* y *NF-YC*, sólo un grupo resaltado en rosa en la Figura 15B contiene genes *NF-YB* que se expresan específicamente en semillas y un grupo de genes *NF-YC* que se expresan preferencialmente en nódulos y raíces (Figura 15C, cuadro azul). Un gen que resulta interesante desde el punto de vista del desarrollo radical es *AtNF-YB2*, cuya sobreexpresión promueve la elongación de las raíces principales en *Arabidopsis*, acelerando las divisiones celulares y/o la elongación (Ballif et al., 2011), por lo que genes cercanos a él podrían desempeñar funciones similares en otras especies. Por otro lado, se ha demostrado que *PvNF-YC1* regula tanto la infección por rizobios como la organogénesis del nódulo en *P. vulgaris*. A su vez, *MtNF-YC1* y *MtNF-YC2*, en presencia de *MtNF-YB16*, son capaces de formar un complejo NF-Y estable *in planta* con *MtNF-YA1* y *MtNF-YA2* (Baudin et al., 2015), que como se mencionó previamente, son requeridos para la infección bacteriana durante la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*. Estos ejemplos aportan evidencia de la relación evolutiva y funcional entre miembros de la familia NF-YC.

Figura 15. Árboles filogenéticos que comparan familias NF-Y en *P. vulgaris*, *M. truncatula*, *G. max*, y *Arabidopsis*.

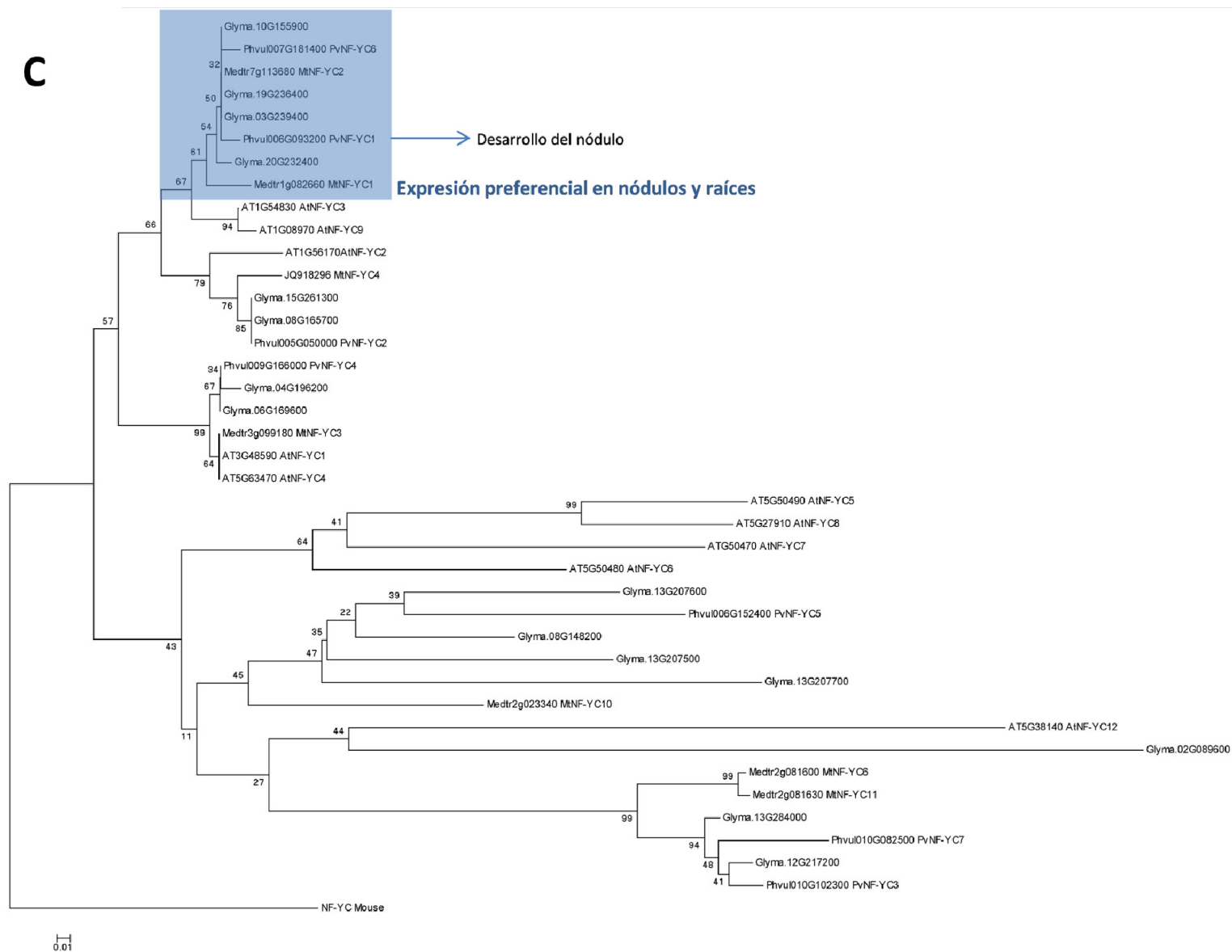
Relación filogenética de la familia NF-YA (A), NF-YB (B), y NF-YC (C) de *P. vulgaris*, *M. truncatula*, soja y *Arabidopsis*. Alineamientos múltiples de secuencia se generaron utilizando las secuencias completas de proteínas NF-Y con ClustalW (Thompson et al., 1994). Se construyeron árboles filogenéticos utilizando el método de neighbor-joining basado en el análisis de alineación de múltiples secuencias utilizando MEGA5. Valores de fiabilidad en cada rama representan los valores de *bootstrap* (10000 repeticiones). Se resaltan en cuadros miembros de cada familia con expresión preferencial en un tejido particular. Se utilizaron las subunidades NF-Y de ratón como raíz de los árboles. Se incluyeron los códigos de identificación de los genes a partir de la base de datos del genoma disponible en TAIR o Phytozome. Para MtNF-YB18 y MtNF-YC4, que no tienen un identificador génico en la base de datos del genoma de *M. truncatula*, se incluyeron los números de acceso de GenBank. El mayor número de miembros NF-Y en soja en comparación con las otras especies de plantas se puede explicar por un evento reciente de duplicación de todo su genoma.



B



C



3. Análisis de la expresión de genes *PvNF-Ys* en diferentes órganos y durante la asociación simbiótica con *R. etli*

El análisis de expresión de miembros individuales de cada familia NF-Y realizado previamente en *Arabidopsis*, arroz, trigo (*Triticum aestivum*), *Brachypodium distachion* y canola reveló que varios miembros de las familias de cada subunidad presentan patrones de expresión específicos de órgano (Gusmaroli et al., 2002; Stephenson et al., 2007; Thirumurugan et al., 2008; Siefers et al., 2009; Cao et al., 2011; Liang et al., 2014). En leguminosas, se ha realizado el análisis de expresión para miembros individuales de estas familias génicas en diferentes etapas de la formación de nódulos o durante la micorrización arbuscular (Combier et al., 2006; Combier et al., 2008; Zanetti et al., 2010; Hogeekamp et al., 2011; Schaarschmidt et al., 2013; Soyano et al., 2013; Laloum et al., 2014; Laporte et al., 2014). Sin embargo, no se había reportado hasta el momento de la realización de esta tesis un análisis sistemático de la expresión génica para cada miembro de estas familias en leguminosas. Es por ello que se caracterizó el patrón de expresión de los diferentes miembros de cada familia PvNF-Y en órganos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas de poroto por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa (RT-qPCR). Se diseñaron pares de *primers* específicos para cada miembro PvNF-Y (Tabla S4), los cuales se usaron para cuantificar la abundancia relativa de transcriptos de PvNF-Y en hojas, tallos, raíces y nódulos formados por una cepa de *R. etli* altamente eficiente en la formación de nódulos (SC15) o con una menos eficiente (55N1) a los 7 y 14 días post-inoculación (dpi).

Expresión de genes de la familia *PvNF-YA*. El análisis reveló que todos los miembros presentan niveles de transcriptos detectables en al menos uno de los órganos

examinados (Figura 16). *PvNF-YA2*, -*YA4*, -*YA5* y -*YA7* presentaron niveles más altos de mRNAs en hojas y tallo en comparación con las raíces. Por otro lado, los niveles de transcritos de *PvNF-YA3* fueron 20 veces más altos en tallo que en hojas o raíces. *PvNF-YA6*, -*YA8* e -*YA9* presentaron niveles de transcritos detectables en tallo y raíces, pero en muy bajos en tejido de hojas. Para *PvNF-YA1* en particular, se observó acumulación de transcritos en raíces, pero no en tejidos fotosintéticos. Por otro lado, nódulos de 14 dpi de *P. vulgaris* acumulan mayores niveles de mRNAs de *PvNF-YA1*, -*YA4*, -*YA7* e -*YA8* en comparación con raíces o nódulos de 7 dpi, mientras que los niveles de mRNA de *PvNF-YA9* fueron más altos en nódulos de 7 dpi que en raíces o nódulos maduros (14 dpi). Resultó interesante que la expresión de *PvNF-YA1* y -*YA4* fuera mayor en nódulos de 14 dpi formados por la cepa de *R. etli* altamente eficiente SC15 que con la menos eficiente 55N1, mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión de *PvNF-Y9* entre nódulos ocupado por SC15 ó 55N1.

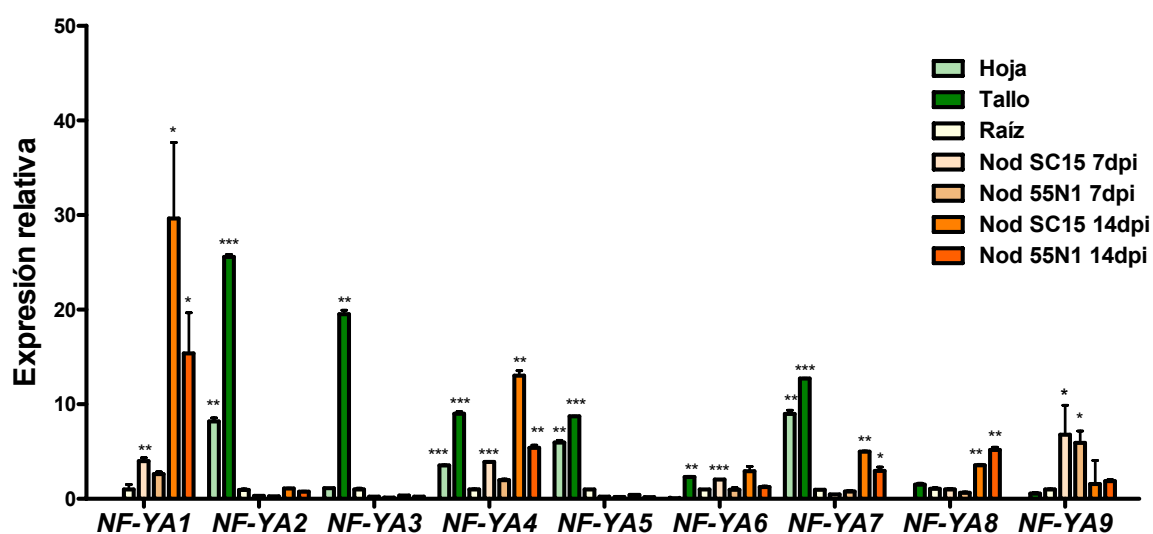


Figura 16. Perfil de expresión de *PvNF-YAs*.

Patrón de expresión de los miembros de la familia génica *PvNF-YA* en distintos órganos de *P. vulgaris* obtenidos mediante RT-qPCR. Los datos de expresión fueron normalizados usando los datos correspondientes al gen *eEF1α* (eukaryotic elongation factor 1 α) y presentados en relación a los valores de expresión en raíz. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos tres repeticiones técnicas. Los resultados son representativos de dos experimentos biológicos independientes. Asteriscos individuales, dobles y triples indican que los valores son significativamente diferentes del valor control en un *t-test* $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente.

Expresión de *PvNF-YBs*. El análisis de la familia *PvNF-YB* reveló que siete miembros, *PvNF-YB1*, -*YB6*, -*YB8*, -*YB10*, -*YB11*, -*YB12* e -*YB14*, presentan niveles de expresión

más altos en tejidos fotosintéticos en comparación con raíces y nódulos (Figura 17). Por otro lado, *PvNF-YB2* e *-YB3* exhibieron mayores niveles de transcritos en tallo que en hojas, raíces y nódulos. Por otro lado, *NF-YB7* e *-YB13* presentaron mayores niveles de expresión en nódulos que en raíces y tejidos aéreos. Además, la expresión de *PvNF-YB1*, *-YB2* e *-YB7* fue mayor en nódulos de 14 dpi que en raíces o nódulos de 7 dpi. Curiosamente, la expresión de *PvNF-YB10*, *-YB12* y *-YB13* fue muy baja en raíces, pero mayor en nódulos de 14 dpi formados por la cepa SC15, en comparación con los formados por la cepa 55N1. En particular, los niveles de mRNA de *PvNF-YB12* también fueron superiores en nódulos jóvenes (7dpi) formados por SC15 que por 55N1.

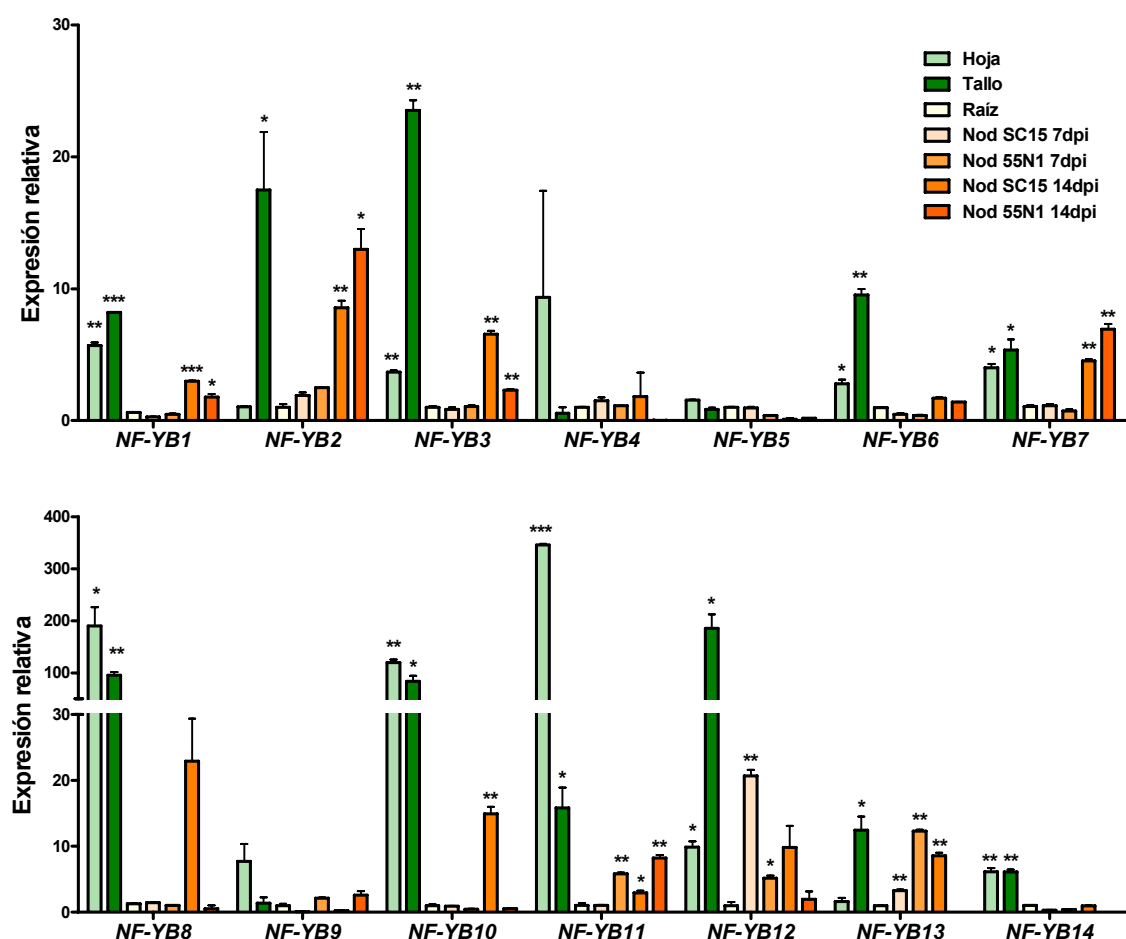


Figura 17. Perfil de expresión de *PvNF-YBs*. Patrón de expresión de los miembros de la familia génica *PvNF-YB* en distintos órganos de *P. vulgaris* obtenidos mediante RT-qPCR. Los datos de expresión fueron normalizados usando los datos correspondientes al gen *eEF1α* y presentados en relación con los valores de expresión en raíz. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos tres repeticiones técnicas. Los resultados son representativos de dos experimentos biológicos independientes. Asteriscos individuales, dobles y triples indican que los valores son significativamente diferentes del valor control en un *t-test* $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente.

Expresión de *PvNF-YCs*. El análisis de la expresión de los miembros *PvNF-YC* en diferentes órganos (Figura 18) reveló que *PvNF-YC1* se expresa en todos los tejidos evaluados, coincidiendo con lo reportado previamente (Peltzer Meschini et al., 2008). Los transcritos de tres miembros de esta familia (*PvNF-YC2*, *-YC3* e *-YC5*) se acumulan en mayor medida en tejido de hojas y tallos que en raíces o nódulos (de 10 a 100 veces). Por otro lado, los niveles de transcritos de *PvNF-YC4* fueron moderadamente más altos en hojas y tallos en comparación a raíces, y menores en nódulos de 7 y 14 dpi. Por otro lado, los mRNAs de *PvNF-YC6* fueron casi indetectables en hojas, pero mostraron altos niveles de expresión en tallo. Los mayores niveles de mRNAs de *PvNF-YC7* se detectaron en raíces y en menor medida en nódulos de 7 dpi.

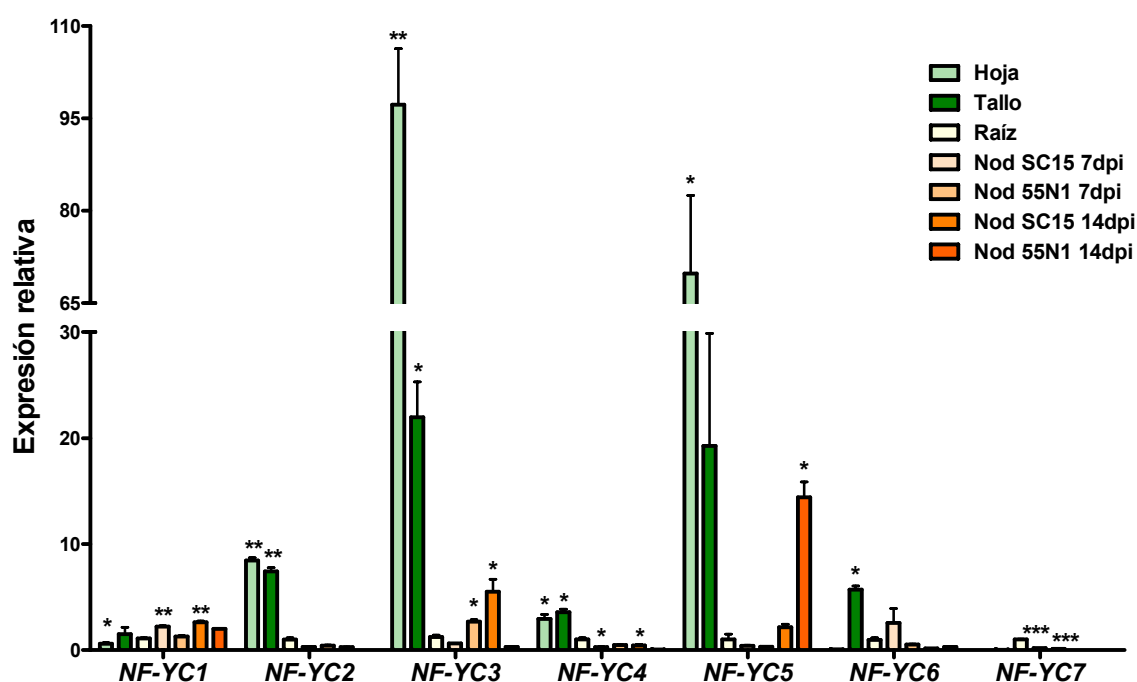


Figura 18. Perfil de expresión de *PvNF-YCs*.

Patrón de expresión de los miembros de la familia génica *PvNF-YC* en distintos órganos de *P. vulagris* obtenidos mediante RT-qPCR. Los datos de expresión fueron normalizados usando los datos correspondientes al gen *eEF1α* y presentados en relación con los valores de expresión en raíz. Las barras de error representan la desviación estándar (SD) de al menos tres repeticiones técnicas. Los resultados son representativos de dos experimentos biológicos independientes. Asteriscos individuales, dobles y triples indican que los valores son significativamente diferentes del valor control en un *t-test* $p < 0,05$, $0,01$ y $0,001$, respectivamente.

Posteriormente, nos propusimos identificar genes PvNF-Y que se expresan diferencial o específicamente en etapas tempranas de la asociación simbiótica. Por lo tanto, se examinaron los niveles de transcritos de los genes PvNF-Y en raíces a 24 horas post-inoculación (hpi) con la cepa SC15, la cepa 55N1 o con el medio utilizado para el crecimiento de rizobios (YEM) como control.

Expresión de PvNF-YAs. El análisis de expresión a tiempos tempranos de la interacción simbiótica identificó 2 transcritos de la familia PvNF-YA que aumentan significativamente en respuesta a los rizobios, *PvNF-YA1* e *-YA9*, mientras que el resto de los miembros no presentaron cambios significativos en las condiciones ensayadas (Figura 19A). Los niveles de mRNA de *PvNF-YA1* aumentaron alrededor de cinco veces frente a la inoculación con la cepa de *R. etli* más eficiente SC15, pero no cambiaron significativamente con la cepa 55N1. Por otro lado, *PvNF-YA9* aumentó con ambas cepas de rizobio, aunque la magnitud del aumento fue mayor con SC15 que con 55N1 (> 90 veces *versus* 40 veces, respectivamente).

Expresión de PvNF-YBs. El análisis de la familia PvNF-YB en raíces a las 24 hpi con *R. etli* reveló varios miembros que aumentan significativamente sus niveles de transcritos en etapas tempranas de la asociación simbiótica. En particular, la mayoría de estos transcritos se acumularon a niveles más altos (por ejemplo *PvNF-YB4*, *-YB5* e *-YB13*) o exclusivamente (por ejemplo *PvNF-YB8*, *-YB11* e *-YB14*) con la cepa 55N1 en comparación con la cepa SC15, al menos al tiempo post-inoculación analizado en este trabajo (Figura 19B). Por otro lado, dos miembros de esta familia, *PvNF-YB1* e *-YB3*, disminuyeron significativamente sus niveles frente a la inoculación con la cepa SC15.

Expresión de PvNF-YCs. El análisis de la familia PvNF-YC en las primeras etapas de la interacción simbiótica reveló que *PvNF-YC1* aumentó exclusivamente en respuesta a

la cepa SC15, tal como se ha descrito previamente (Peltzer Meschini et al., 2008; Zanetti et al., 2010) mientras que los niveles de *PvNF-YC6* aumentaron sólo en raíces inoculadas con la cepa 55N1. Por otra parte, cuatro miembros de esta familia (*PvNF-YC3*, *-YC4*, *-YA5* e *-YA7*) presentaron mayores niveles de transcritos en respuesta a ambas cepas; aunque, como se ha observado para algunos miembros *PvNF-YB*, el cambio en la expresión génica fue mayor en las raíces inoculadas con la cepa 55N1 que en las inoculadas con SC15 (Figura 19C).

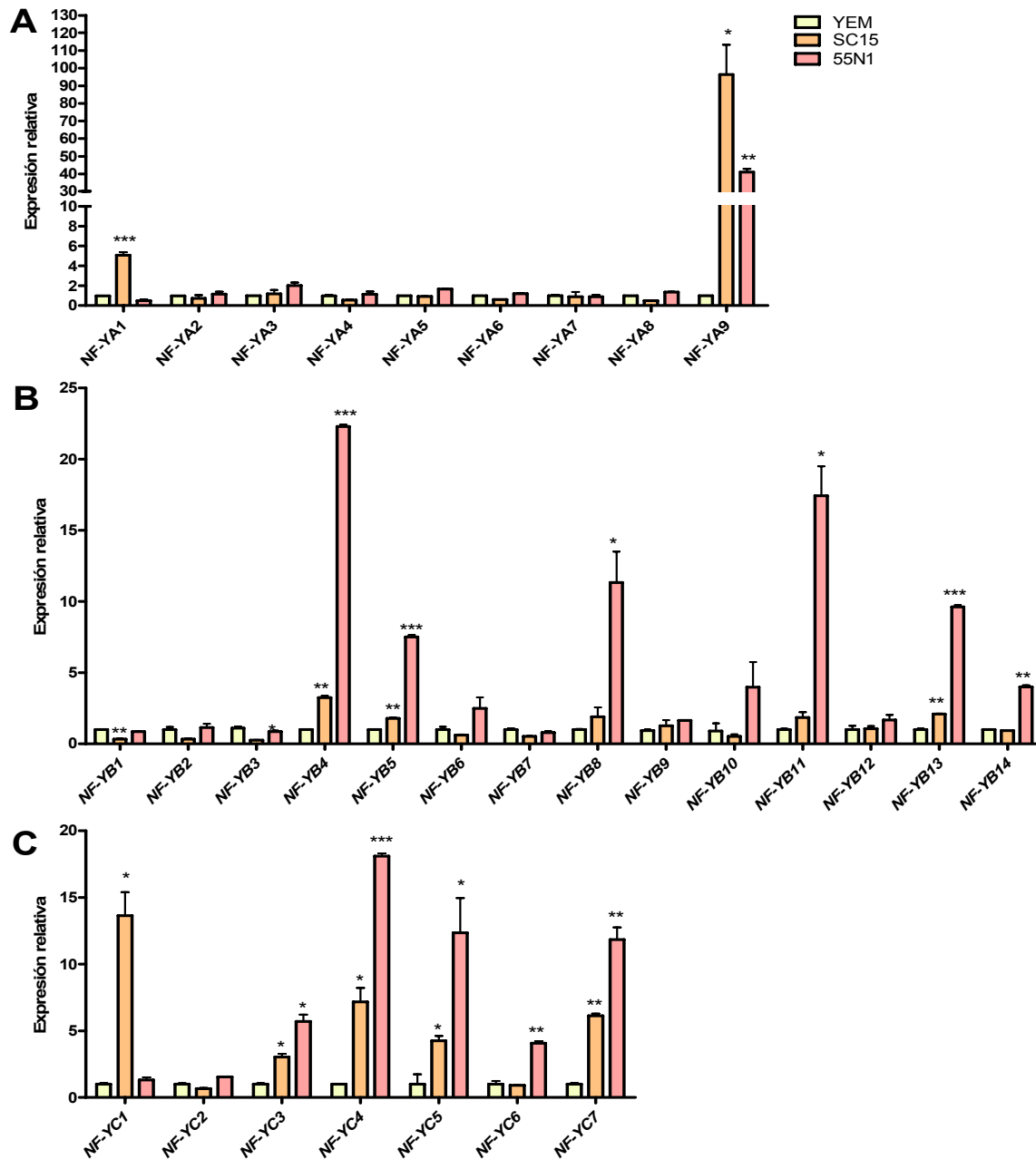


Figura 19. Análisis de la expresión a tiempos tempranos de los miembros de la familia NF-Y en *P. vulgaris* en raíces inoculadas con las cepas de *R. etli* SC15 ó 55N1. Niveles de transcritos medidos por qRT-PCR de cada gen de la familia PvNF-YA (A), PvNF-YB (B) y PvNF-YC (C) en raíces de tipo salvaje de poroto a las 24 horas después de la inoculación, ya sea con la cepa de *R. etli* SC15 ó 55N1, o con el medio utilizado para el crecimiento de las bacterias (YEM) como control. Los datos de expresión se normalizaron a partir de datos de expresión del gen *eEF1a* y se encuentran presentados relativos a las raíces control, a las cuales se les asignó un valor arbitrario de 1. Las barras de error representan el desvío estándar de al menos tres repeticiones técnicas. Los resultados son representativos de dos experimentos biológicos independientes. Asteriscos individuales, dobles y triples indican que los valores son significativamente diferentes del valor del control de acuerdo al *t*-test de *Student* con $p < 0.05$, 0.01 y 0.001 , respectivamente.

Capítulo I - Discusión

En la última década, los análisis funcionales de distintos miembros de la familia NF-Y en diversas especies vegetales han demostrado que, durante el curso de la evolución, varios genes NF-Y en plantas han adquirido funciones específicas en diversos procesos como embriogénesis, floración, estrés por sequía, desarrollo de raíces y nódulos (Laloum et al., 2013). Dado el número y la diversidad de genes NF-Y en plantas, pareciera que los ejemplos mencionados representan sólo la punta del *iceberg* y que quedarían muchas funciones de estos factores de transcripción por descubrir. En este trabajo de tesis, hemos identificado, anotado y caracterizado la expresión de 9, 14 y 7 miembros de las familias PvNF-YA, PvNF-YB y PvNF-YC, respectivamente (Tabla 1). El número de genes identificados para cada familia en *P. vulgaris* es similar al de arroz, pero menor que el reportado previamente en Arabidopsis y en la leguminosa modelo *M. truncatula* (Laloum et al., 2013). Esto podría ser consecuencia de la secuenciación incompleta del genoma de poroto (Schmutz et al., 2014), o bien de una contracción de estas familias génicas en esta planta leguminosa. La duplicación es una característica predominante de los genomas de plantas y se han sugerido tres destinos evolutivos potenciales para los duplicados génicos (Lynch and Conery, 2000): (i) una copia del par simplemente se silencia por mutaciones degenerativas después de la duplicación del gen (no-funcionalización); (ii) una copia adquiere una función nueva y benéfica que es conservada por selección natural (neofuncionalización), mientras que la otra copia retiene su función original; y (iii) ambos duplicados experimentan pérdida o reducción de expresión para diferentes subfunciones por mutaciones degenerativas y como consecuencia establecen funciones complementarias distintas (subfuncionalización). Las cuestiones relativas a si los genes duplicados están sometidos a diferentes patrones evolutivos de duplicación, y cuáles son los factores que determinan el destino de los genes duplicados, son motivo de intensa investigación

(Zhang et al., 2003). La especialización funcional de los genes NF-Y es resultado de diversos mecanismos complementarios. Análisis de expresión han revelado que tanto los patrones de expresión ubicuos como los más especializados pueden coexistir en diferentes plantas, sugiriendo que la diversificación de los promotores juega un rol muy importante. Existen varios ejemplos llamativos de conservación de patrones de expresión vinculados a la especialización funcional dentro genes evolutivamente relacionados de las familias *NF-YA* y *NF-YB* (Figuras 15A y 15B). Resulta interesante resaltar que tales especificidades se encontraron dentro de los genes *NF-YA*, a pesar de que parecen haber sufrido una evolución menos asimétrica en comparación con los *NF-YB* y *NF-YC* (Yang et al., 2005).

El análisis estructural de los genes *PvNF-YA* reveló que todos los miembros de esta familia contienen cinco o más intrones distribuidos en su extremo 5', 3' UTR o dentro de la región codificante. Consistentemente, se ha publicado recientemente que los genes *NF-YA* de *A. thaliana* y canola son también altamente estructurados (Liang et al., 2014). Cinco miembros de la familia *PvNF-YA* contienen uORFs en su 5'UTR cuando retienen algún intrón (Figura 12). Estos uORFs pueden actuar ya sea limitando la traducción de los ORF principales (Juntawong et al., 2014) o conduciendo a la síntesis de péptidos pequeños putativos que desestabilizan los transcritos de *NF-YA* (Combiere et al., 2008). En *M. truncatula*, *A. thaliana* y arroz, la mayoría de los miembros de la familia *NF-YA* tienen al menos 1 intrón en la región 5'UTR (Laloum et al., 2013), lo que sugiere que esto podría ser un mecanismo de regulación conservado entre los genes *NF-YA* de plantas. Sin embargo, a partir de una búsqueda TBLASTN utilizando la secuencia del péptido codificado por el uORF1 del gen *MtNF-YA1* de *M. truncatula* contra las bases de datos genómica de otras especies, encontramos que este péptido no se encuentra conservado en otras especies, tanto leguminosas (como *P. vulgaris* y soja) como no leguminosas (como *Arabidopsis* y arroz). Por otro lado, el análisis de la organización intrón/exón de miembros de la familia *NF-YB* y *NF-YC* indicó que la mayoría de estos genes son menos estructurados que los genes *NF-YA* (Figura 11),

coincidiendo con los previamente reportado para sus ortólogos putativos en *A. thaliana* y canola. Por el contrario, los genes NF-YAs, NF-YBs y NF-YCs de arroz poseen diferentes estructuras que *A. thaliana*, canola y poroto (Liang et al., 2014). Esto sugiere que existe divergencia en las estructuras de los genes NF-Y entre plantas mono y dicotiledoneas.

El análisis de expresión en ciertos tejidos de poroto mostró que los genes NF-Y presentan perfiles de expresión muy diversos (Figuras 16-19). Algunos de ellos mostraron una expresión ubicua (por ejemplo *PvNF-YA4* y *PvNF-YC1*) mientras que otros exhiben un patrón de expresión específico de órganos (por ejemplo *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* en raíces y nódulos, o bien *PvNF-YA2*, *PvNF-YB14* y *PvNF-YC2* en tejidos fotosintéticos). Algunos de estos genes NF-Y cuyos transcriptos se acumulan a altos niveles en hojas o tallos -por ejemplo, *PvNF-YB1*, -*YB3*, -*YB4*, -*YB8*, -*YC2* y -*YC5*- corresponden a secuencias relacionadas con miembros de Arabidopsis (Figura 15) implicados en la respuesta al estrés de proteína no plegadas (UPR, *unfolded protein response*) de retículo endoplásmico y/o en la promoción de la floración, tales como *AtNF-YB3*, *AtNF-YB2* y *AtNF-YC2* (Petroni et al., 2012; Laloum et al., 2013).

En el contexto de la simbiosis, identificamos dos miembros de la familia *PvNF-YA*, *PvNF-YA1* y -*YA9*, que se expresan a altos niveles en nódulos en comparación con otros tejidos (Figura 16). Tanto *PvNF-YA1* como -*YA9* también mostraron una expresión diferencial frente a la cepa de *R. etli* de alta eficiencia en etapas tempranas de la interacción (Figura 19A), lo que sugería que los mismos podrían tener una función en la selección de pares simbióticos, como se ha observado previamente para *PvNF-YC1* (Zanetti et al., 2010). En forma similar, no pudimos identificar miembros de la familia *PvNF-YB* que sean exclusivamente inducidos, o a mayores niveles, con la cepa de *R. etli* más eficiente SC15 a las 24 hpi; sin embargo, algunos miembros son regulados diferencialmente por esta cepa a otros tiempos durante la asociación simbiótica, ya que mRNAs de *PvNF-YB8*, -*YB10* y -*YB12* se acumulan a niveles más altos en nódulos formados por SC15 que en los formados por la cepa menos eficiente,

55N1 (Figura 17). Curiosamente, un análisis filogenético reportado por (Soyano et al., 2013) indicó que la proteína PvNF-YB10 se encuentra en el mismo clado que la subunidad LjNF-YB1, la cual es capaz de interactuar físicamente con LjNF-YA1 y promover divisiones celulares de la raíz y la activación transcripcional del gen del ciclo celular *ciclina B*. Curiosamente, en nuestro laboratorio se había demostrado previamente que *PvNF-YC1* es requerido para la regulación de la expresión de *ciclina B* en respuesta al rizobio, y que la sobreexpresión de *PvNF-YC1* aumentó el número de nódulos en raíces de *P. vulgaris* (Zanetti et al., 2010). En conjunto, estos antecedentes nos llevan a hipotetizar que los productos de los genes *PvNF-YA1/9*, *PvNF-YB7/10* y *PvNF-YC1* podrían actuar conjuntamente en el mismo complejo heterotrimérico controlando los genes del ciclo celular y promoviendo las divisiones celulares corticales que llevan a la formación del primordio de nódulo.

CAPÍTULO II

Resultados y discusión

Capítulo II – Caracterización funcional de PvNF-YA1 en la asociación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. etli*

Teniendo en cuenta el patrón de expresión de los diferentes miembros de la familia NF-Y (Capítulo I) se decidió profundizar el estudio de aquellos miembros que pudieran cumplir una función clave en la nodulación, actuando o no conjuntamente con la subunidad PvNF-YC1, la cual es requerida tanto para la organogénesis de nódulos como la infección rizobiana (Zanetti et al., 2010). En este capítulo de tesis se abordó, particularmente, la caracterización de un miembro de la familia de NF-YA, *PvNF-YA1*, el cual presenta un patrón de expresión específico de nódulos. Los niveles de transcritos de *PvNF-YA1* fueron casi indetectable en hojas y tallo, bajos en raíces y entre 20 y 25 veces más altos en nódulos jóvenes y maduros en comparación con el tejido de la raíz (ver Figura 16, Capítulo I). Coincidentemente, Laloum y colaboradores reportaron que el ortólogo putativo de *PvNF-YA1* de *M. truncatula*, *MtNF-YA2*, se expresa tanto en nódulos como en raíces, mientras que su homólogo más cercano *MtNF-YA1* (o *MtHAP2-1*) se expresa específicamente en nódulos formados por esta leguminosa (Laloum et al., 2014). Por otra parte, los niveles de transcritos de *PvNF-YA1* se acumulan específicamente en etapas tempranas de la interacción simbiótica con la cepa de *R. etli* más eficiente SC15 (ver Figura 19A), lo que sugiere que *PvNF-YA1* podría tener una función en la especificidad de cepa semejante a la observada previamente para *PvNF-YC1*.

1. Análisis de la secuencia de PvNF-YA1

La subunidad NF-YA1 de *P. vulgaris* posee 330 aminoácidos, una masa molecular estimada de 36,1 kDa y un pI de 9.23. Como se mencionó anteriormente, contiene los dominios requeridos para la interacción con las otras dos subunidades del complejo NF-Y y con el DNA. Una búsqueda *BLASTP* para identificar secuencias homólogas en la base de datos de proteínas *nr* (no redundante) mostró que la proteína con mayor porcentaje de identidad (87 %) y menor valor de *e* (0) a la secuencia de aminoácidos de PvNF-YA1 corresponde a la subunidad GmNF-YA10 de soja. Un alineamiento múltiple en el cual se incluyeron las secuencias proteicas con mayores porcentajes de identidad de secuencia correspondientes a las especies *G. max*, *L. japonicus*, *M. truncatula* y *A. thaliana* muestra una alta conservación de secuencia entre las diferentes especies (Figura 20).

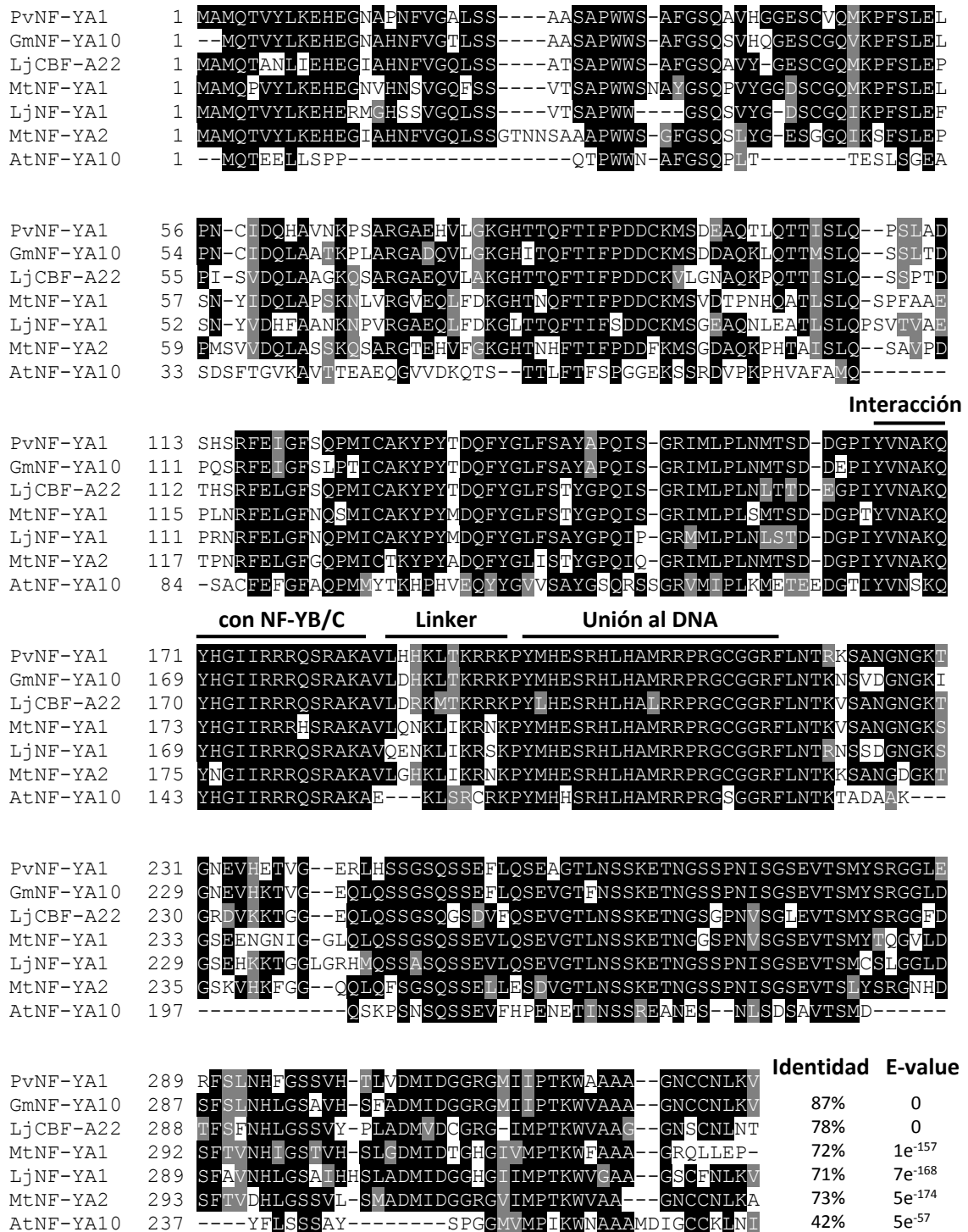


Figura 20: Alineamiento múltiple de PvNF-YA1 y las secuencias con mayor porcentaje de identidad en *Glycine max*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana*.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos completa de PvNF-YA1 con las proteínas de mayor porcentaje de identidad detectadas por BLASTP en diferentes especies vegetales. Los residuos remarcados en negro indican aminoácidos idénticos, mientras que las sustituciones conservativas se remarcaban en gris. Los alineamientos fueron generados con ClustalW y formateados con BOXSHADE. También se indican el dominio de unión al DNA y los dominios necesarios para la interacción con las otras subunidades, definidos previamente en levadura y mamíferos. El porcentaje de identidad y los valores de e de cada proteína respecto a PvNF-YA1 se indican al final de la figura.

2. Localización subcelular y perfil de expresión de PvNF-YA1

El programa PSORT II (Horton and Nakai, 1997), el cual predice la localización subcelular de proteínas, identificó dos señales de localización nuclear de tipo pat4 en las posiciones 192 (KRRK) y 208 (RRPR) de la secuencia proteica de PvNF-YA1 y predijo una localización nuclear con un 89 % de confiabilidad, basado en el método de Reinhardt para discriminación citoplásmica/nuclear (Reinhardt and Hubbard, 1998). Con el objetivo de evaluar experimentalmente la localización subcelular de esta proteína, el ORF de *PvNF-YA1* se clonó en el plásmido pMDC43 para generar una fusión traduccional entre la proteína fluorescente verde (GFP) y PvNF-YA1, bajo el control del promotor 35S (Figura 21A). La fusión GFP-PvNF-YA1 se introdujo en hojas de *Nicotiana benthamiana* por agroinfiltración. Las células que expresaban GFP-PvNF-YA1 mostraron señal de GFP predominantemente en el núcleo de las células epidérmicas (Figura 21B). Esta localización subcelular se correlaciona con lo anteriormente descrito para las proteínas NF-YA2 y NF-YA4 en *Arabidopsis* (Liu and Howell, 2010; Hackenberg et al., 2012) y NF-YA1 y NF-YA2 de *M. truncatula* (Baudin et al., 2015).

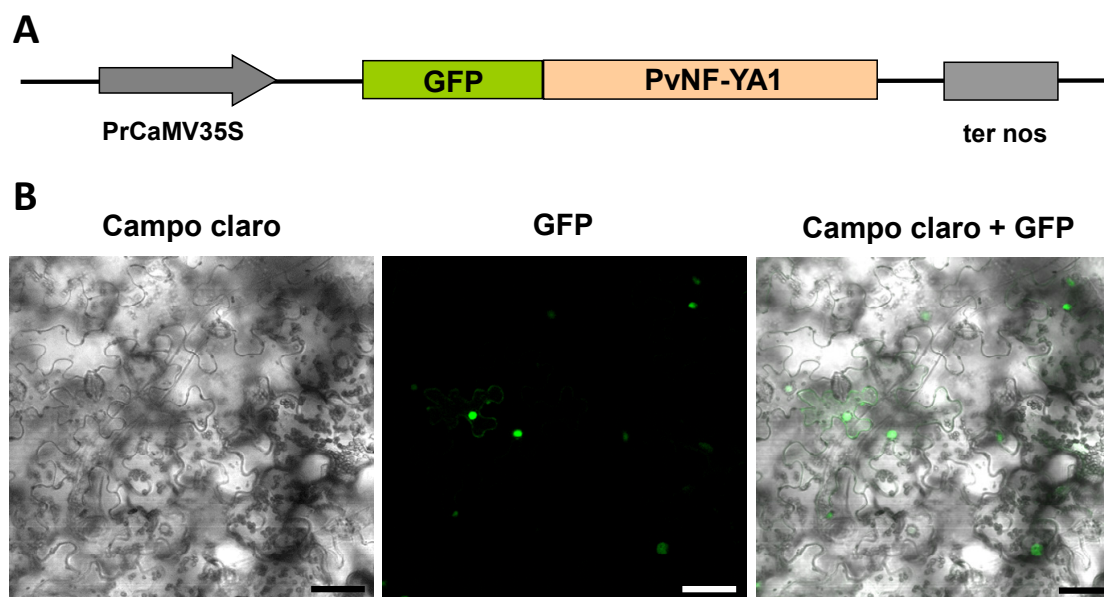


Figura 21: Localización subcelular de PvNF-YA1 en hojas de *N. benthamiana*

A. Esquema de la construcción empleada para el análisis funcional de PvNF-YA1 mediante su fusión a la proteína fluorescente GFP. PrCaMV35S: promotor del gen 35S del virus del mosaico del coliflor. Ter nos: terminador de la nopalina sintasa.

B. Localización subcelular de la fusión traduccional GFP-NF-YA1 en células epidérmicas de hojas de *Nicotiana benthamiana*. La misma imagen, obtenida por microscopía confocal, se muestra bajo luz blanca (campo claro), UV (GFP) y luz blanca + UV (campo claro + GFP). Barra de la escala: 50 μ m.

En paralelo, haciendo uso del sistema de transformación de raíces de *P. vulgaris* mediado por *A. rhizogenes* (Estrada-Navarrete et al., 2006), se generaron plantas compuestas de poroto, las cuales contienen una parte aérea salvaje y raíces transgénicas que expresan la fusión GFP-PvNF-YA1, o bien la proteína GFP soluble como control. A partir del día 8 luego de la transformación comenzó a visualizarse la formación de callos, de donde emergieron las raíces transgénicas (*hairy roots*). Al cabo de 15 días, cuando las raíces transgénicas estaban bien desarrolladas y elongadas, se cortó la raíz principal no transgénica y las plantas se transfirieron a cajas acrílicas con medio agar-Fahraeus inclinado suplementado con nitrato (ver Figura 47 de la sección Materiales y Métodos). Luego de 7 días, las raíces se observaron al microscopio confocal. El análisis mostró que la proteína PvNF-YA1 se localiza predominantemente en el núcleo de la células de las raíces de poroto (Figura 22A) y también en los núcleos

de pelos radicales (Figuras 22B y C), mientras que la GFP libre se dispersó entre el núcleo y el citoplasma (Figura 22D).

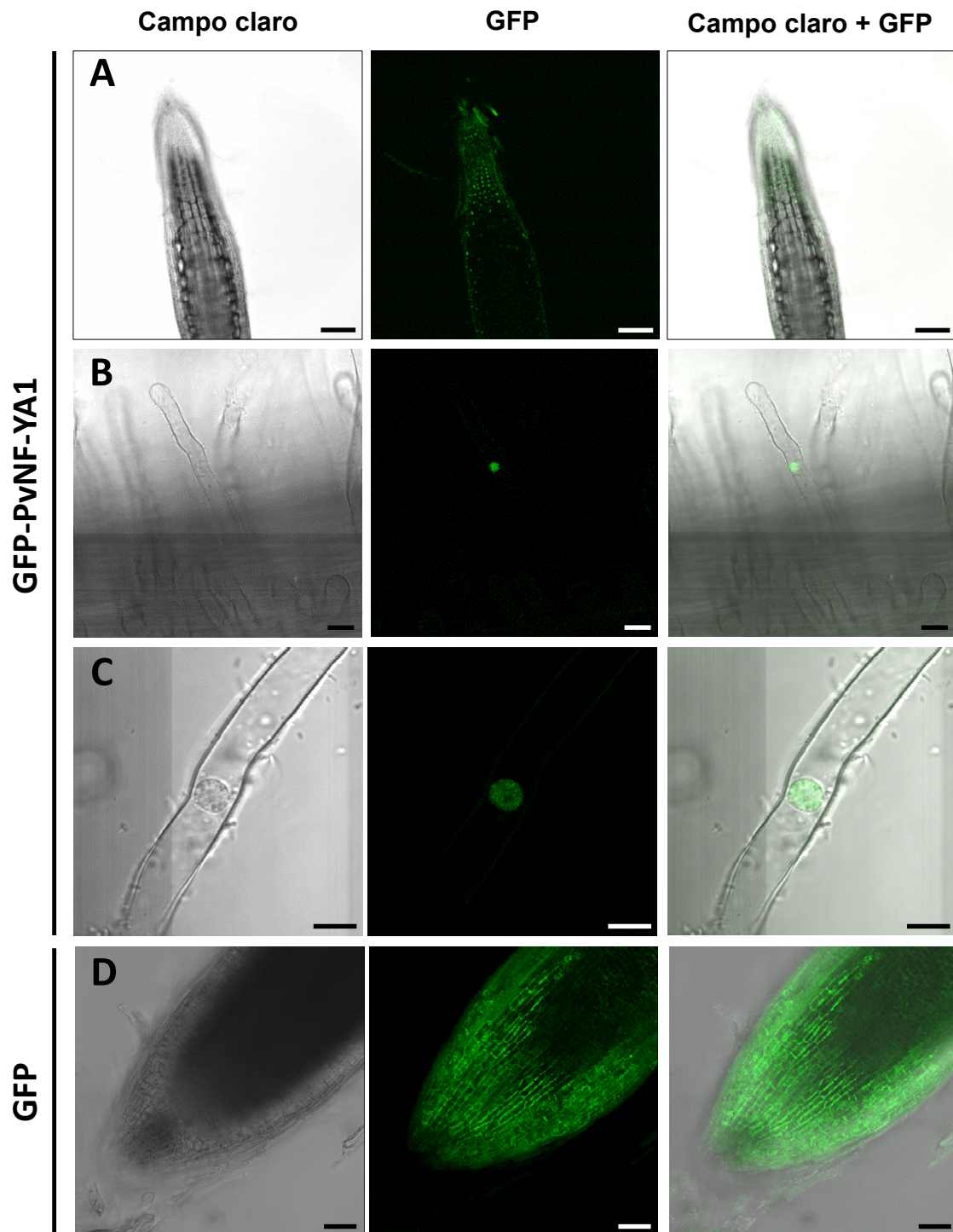


Figura 22: Localización subcelular de PvNF-YA1 en raíces de *P. vulgaris*

Raíces de plantas de poroto que expresan la fusión GFP-NF-YA1 o GFP libre se observaron por microscopía confocal. Imágenes de raíces laterales (**A y D**) y pelos radicales (**B y C**) se muestra bajo luz blanca (campo claro), el canal de GFP (GFP) y luz blanca + canal de GFP (campo claro + GFP). En **D** se muestra la integración en Z de 15 secciones confocales. Barra de la escala: 100 μ m (**A**), 25 μ m (**B**), 8 μ m (**C**) y 50 μ m (**D**).

Con el fin de caracterizar el patrón de expresión espacial de *PvNF-YA1* en raíces de *P. vulgaris* y en los nódulos formados durante la relación simbiótica con *R. etli*, la secuencia promotora de *PvNF-YA1* fue clonada en el vector de destino pKGWFS7, que permite su fusión a las proteínas GFP y β -glucuronidasa (GUS) (Figura 23A). Esta construcción fue introducida en *A. rhizogenes* para la posterior obtención de plantas compuestas con raíces que expresan GFP y GUS bajo el control del promotor de *PvNF-YA1*. Para el análisis de la actividad del promotor se realizó la tinción histológica de las raíces transformadas para detectar la expresión de la proteína GUS. El tejido de raíz fue infiltrado con una solución del reactivo colorante (X-Gluc) e incubado a 37 °C hasta aparición del color azul correspondiente a la actividad GUS. Se observó una tenue tinción de GUS en la zona meristemática cercana al centro quiescente de las raíces laterales (Figura 23B). Cuando estas plantas fueron inoculadas con *R. etli* se observó coloración azul en el tejido central de nódulos de 7 dpi (Figura 23C) y una coloración más intensa a los 14 dpi (Figura 23D). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el perfil de expresión de *PvNF-YA1* del Capítulo I (Figura 16), que muestra una expresión preferencial de este gen en nódulos maduros desarrollados frente a la inoculación con diferentes cepas de *R. etli*.

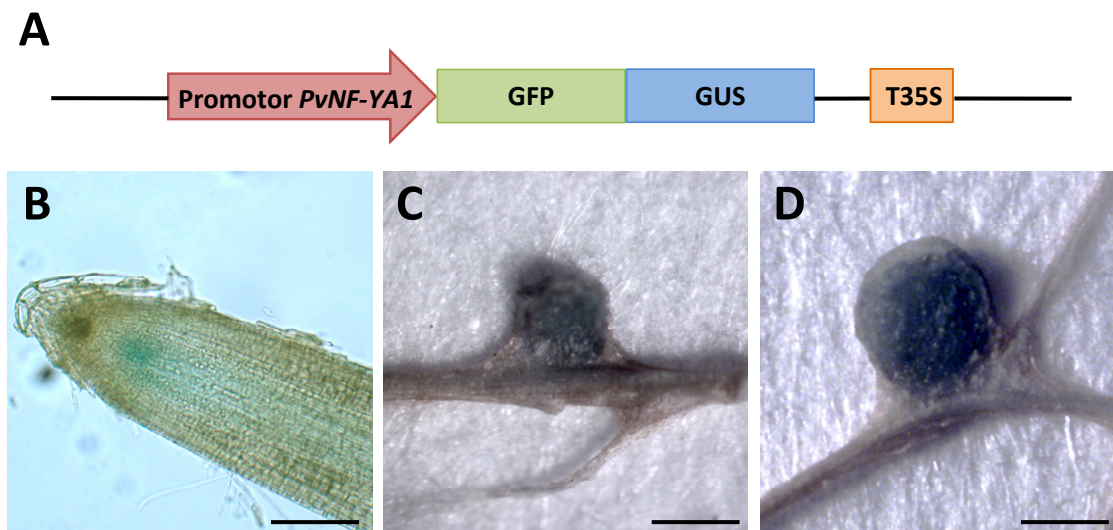


Figura 23. Perfil de expresión de PvNF-YA1 en raíces de *P. vulgaris*

A. Esquema de la construcción empleada para el ensayo histoquímico de actividad glucuronidasa para analizar el perfil de expresión de *PvNF-YA1* en raíces de *P. vulgaris*. T35S: terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor.

B-D. Tinción histoquímica de GUS en raíces laterales (**B**), nódulos de 7dpi (**C**) y 14dpi (**D**) con CFNX5 Ds Red, desarrollados en raíces transgénicas que expresan la fusión de un fragmento de 1.5 kb correspondiente al promotor del *PvNF-YA1* fusionado a las proteínas reporteras GFP y GUS. Barras: 1 mm en (**B**) y 3 mm en (**C**) y (**D**).

3. Interacción de PvNF-YA1 con otras subunidades del factor de transcripción NF-Y

Como se mencionó anteriormente, la gran diversidad de genes de cada una de las subunidades NF-Y existentes en plantas predice una gran variedad de posibles complejos triméricos. Sin embargo, el número real de trímeros NF-Y activos en un tejido en un tiempo determinado, depende tanto de la especificidad de la interacción entre las subunidades como de sus respectivos patrones de expresión. Con el propósito de evaluar si PvNF-YA1 y PvNF-YC1 son capaces de interactuar para formar parte de un mismo complejo proteico, se evaluó la interacción de estas dos subunidades *in planta* mediante ensayos de complementación bimolecular de fluorescencia (BiFC) (Hu et al., 2002). En este método, una proteína fluorescente se divide en dos fragmentos no fluorescentes, amino- (N) y carboxilo-terminal (C) que se fusionan a dos proteínas de interés. El resultado de la interacción de las proteínas es la

reconstitución del fluoróforo (Figura 24A). Las proteínas PvNF-YA1 y PvNF-YC1 se fusionaron a las regiones C y N terminal de la proteína fluorescente YFP (*Yellow fluorescent protein*), respectivamente, y se expresaron en hojas de *N. benthamiana* mediante agroinfiltración. Como control positivo se utilizaron dos proteínas tipo GRAS de *M. truncatula*, NSP1 y NSP2, fusionadas a las regiones N y C terminales de YFP, respectivamente (Hirsch et al., 2009). La interacción entre las proteínas del control positivo NYFP-NSP1 y CYFP-NSP2 fue claramente visible en el núcleo de las células vegetales. Sin embargo, no se pudo detectar fluorescencia en los ensayos de interacción entre PvNF-YA1 y PvNF-YC1 (Figura 24B).

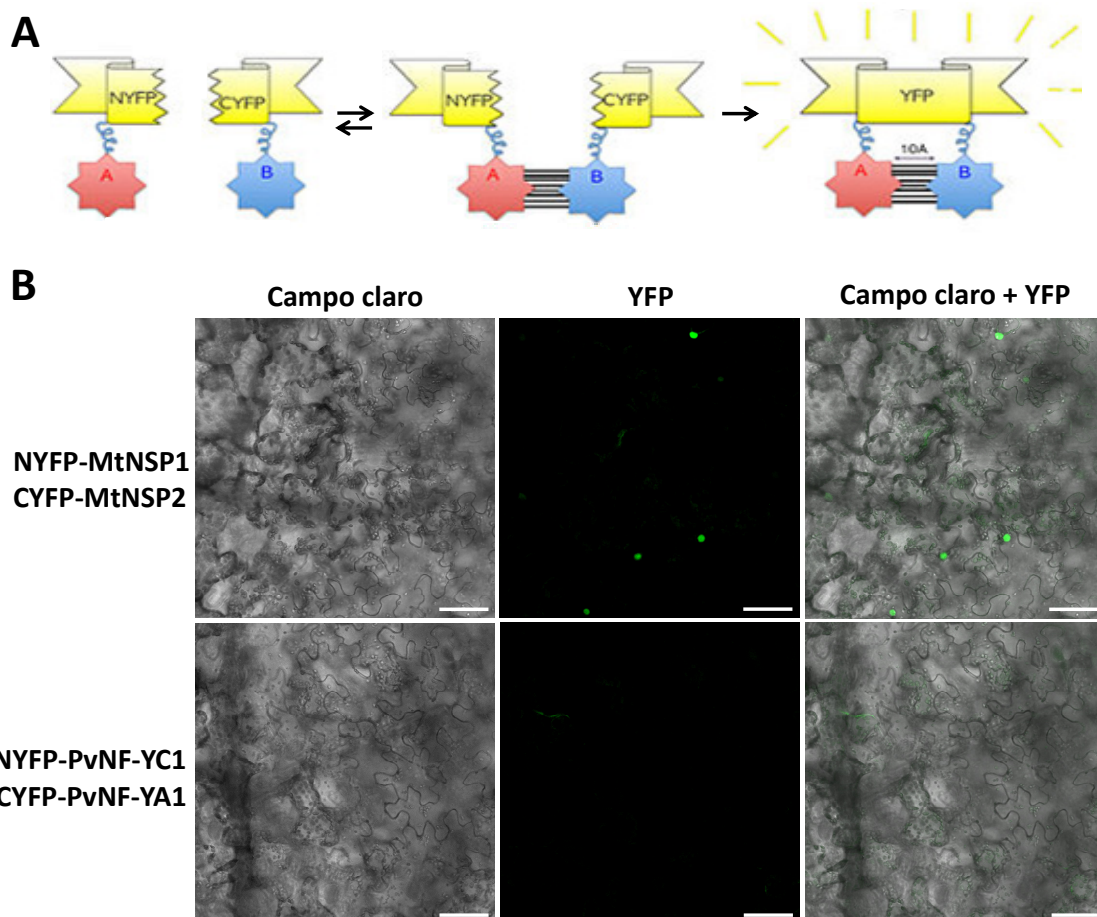


Figura 24: Interacción entre PvNF-YA1 y PvNF-YC1

A. Esquema ilustrativo de la técnica BiFC para detectar interacciones entre proteínas. Cuando se produce la interacción entre las proteínas A, fusionada al extremo N terminal de la YFP (NYFP), y la proteína B, fusionada al extremo C terminal de la YFP (CYFP), se reconstituye la emisión de fluorescencia de YFP.

B. Ensayos de BiFC en hojas de *N. benthamiana*. Las hojas fueron agroinfiltradas con cepas de *A. tumefaciens* que portan las construcciones NYFP-MtNSP1 o CYFP-MtNSP2 como control positivo (panel superior) y CYFP-PvNF-YA1 o NYFP-PvNF-YC1 (panel inferior). La misma imagen, obtenida por microscopía confocal, se muestra bajo luz blanca (campo claro), UV (YFP) y su combinación (Campo claro + YFP). Barra = 50 μ m.

Este resultado negativo concuerda con el modelo actual propuesto para la formación del complejo NF-Y en mamíferos, que postula la dimerización de las subunidades NF-YB y NF-YC en el citoplasma, su traslocación al núcleo y su asociación con la subunidad NF-YA para formar el complejo maduro (Kahle et al., 2005; Petroni et al., 2012). Teniendo en cuenta este modelo, se decidió evaluar la interacción entre las subunidades PvNF-YA1 y PvNF-YC1 en presencia de la subunidad NF-YB mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (CoIP) en *N. benthamiana*. Esta técnica es utilizada para identificar interacciones proteína-proteína mediante el uso de anticuerpos específicos de una proteína *target*, que permite inmunoprecipitar no solo dicha proteína, sino también las proteínas con las cuales interacciona. Para ello, se coexpresó la proteína PvNF-YA1 fusionada al epítopo His₆-FLAG (FLAG-PvNF-YA1) junto a las fusiones YFP-PvNF-YB7 y/o YFP-PvNF-YC1. Si bien no existe ningún reporte en el cual se evidencie la participación de alguna subunidad NF-YB de *P. vulgaris* en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, se seleccionó la subunidad PvNF-YB7 en base al análisis de expresión presentado en el Capítulo I (ver Figura 17), el cual reveló que *PvNF-YB7* se acumula a mayores niveles en nódulos en comparación con el resto de los tejidos. Además, ensayos de secuenciación masiva llevados a cabo en nuestro laboratorio mostraron que *PvNF-YB7* se induce a tiempos tempranos de la inoculación con una cepa de *R. etli* de mayor eficiencia en la formación de nódulos (Dalla Via et al., 2015). La inmunoprecipitación se realizó utilizando anticuerpos anti-FLAG comerciales y la presencia de las subunidades PvNF-YB7 y/o PvNF-YC1 fusionadas a YFP en los inmunoprecipitados se comprobó mediante ensayos de Western blot (WB) utilizando anticuerpos anti-GFP (que reconocen también YFP). En estos ensayos no se detectó interacción directa entre FLAG-PvNF-YA1 y YFP-PvNF-YC1 o FLAG-PvNF-YA1 y YFP-PvNF-YB7 cuando estas subunidades fueron co-expresadas de a pares (Figura 25, calles 3 y 4, respectivamente); sin embargo, sí se pudo evidenciar la formación del trímero PvNF-YA1/PvNF-YB7/PvNF-YC1 cuando se coexpresaron las tres subunidades (Figura 25, calle 5). Por otro lado, no se detectó

interacción entre la proteína YFP libre y PvNF-YA1 (Figura 25, calle 2) o entre YFP con PvNF-YB7 y PvNF-YC1 (Figura 25, calle 1). En resumen, estos resultados indican que PvNF-YA1, PvNF-YB7 y PvNF-YC1 podrían formar parte de un mismo complejo trimérico NF-Y.

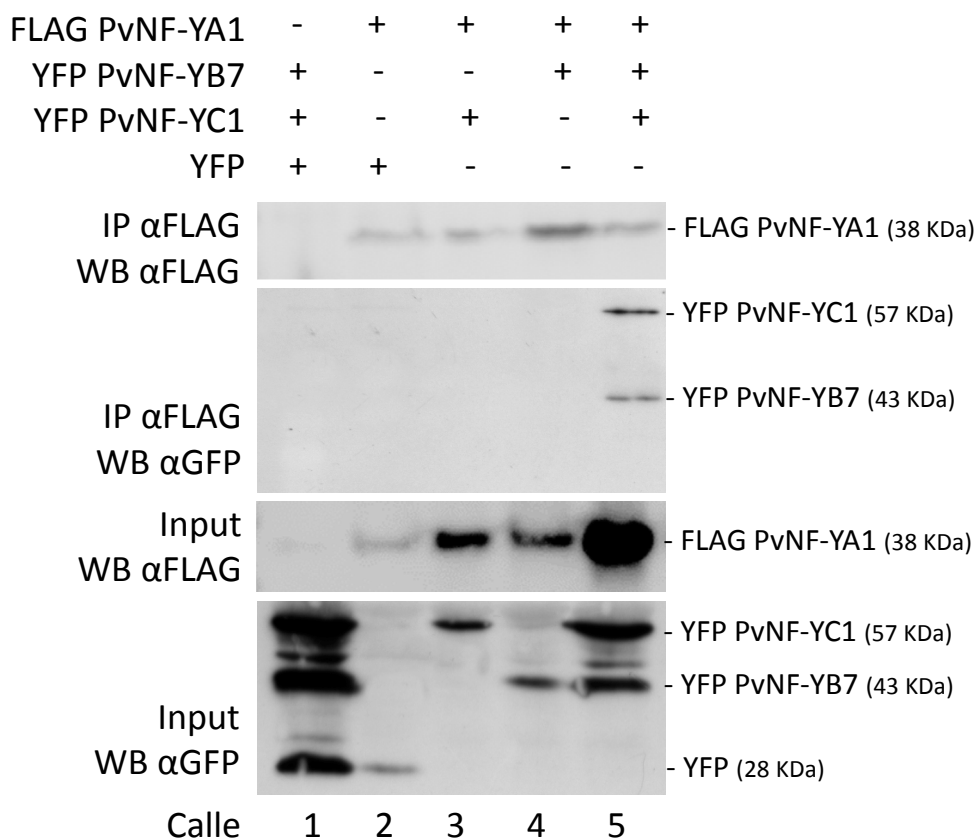


Figura 25. Formación del trímero PvNF-Y.

La fusión FLAG-PvNF-YA1 se coexpresó en *N benthamiana* con PvNF-YB7 y/o PvNF-YC1 fusionadas a YFP. Como controles se incluyeron las combinaciones FLAG-PvNF-YA1 + YFP e YFP-PvNF-YB7 + YFP-PvNF-YC1 + YFP. Las inmunoprecipitaciones se realizaron utilizando bolillas de agarosa αFLAG. Los extractos crudos (Input) y fracciones inmunoprecipitadas (IP) fueron analizados mediante WB. PvNF-YA1 se detectó con anti-FLAG (αFLAG) y PvNF-YB7 y PvNF-YC1 con anticuerpos anti-GFP (αGFP). A la derecha se indican las proteínas identificadas por WB y sus tamaños.

4. Generación de plantas con niveles aumentados de PvNF-YA1

Para investigar la función de PvNF-YA1 en la eficiencia de la nodulación frente a diferentes cepas de rizobios, se generaron plantas compuestas con raíces transgénicas que sobreexpresan PvNF-YA1. La construcción utilizada expresa la subunidad PvNF-

YA1 fusionada a un tag de histidina y al epítopo FLAG bajo el control del promotor 35S (Figura 26A) dentro del vector pK7WG2D. Este vector porta el gen reportero que codifica eGFP (*enhanced GFP*) bajo el control del promotor constitutivo *rolD*, el cual permite discriminar las raíces transgénicas de las no transgénicas por visualización bajo luz UV.

Mediante RT-qPCR se detectó un aumento de 2 a 10 veces en los niveles de transcritos de *PvNF-YA1* en tres plantas compuestas diferentes que expresan la construcción FLAG-*PvNF-YA1*, comparado con las plantas control EV (*empty vector*) transformadas con el vector vacío (Figura 26B). Un ensayo de WB usando anticuerpos anti-FLAG permitió confirmar la expresión de la fusión FLAG-*PvNF-YA1*, aunque en diferentes niveles en raíces transgénicas de las diferentes plantas compuestas analizadas (Figura 26C). Los niveles detectados para las proteínas FLAG-*PvNF-YA1* muestran una buena correlación con los niveles de transcritos *PvNF-YA1* detectados en estas plantas.

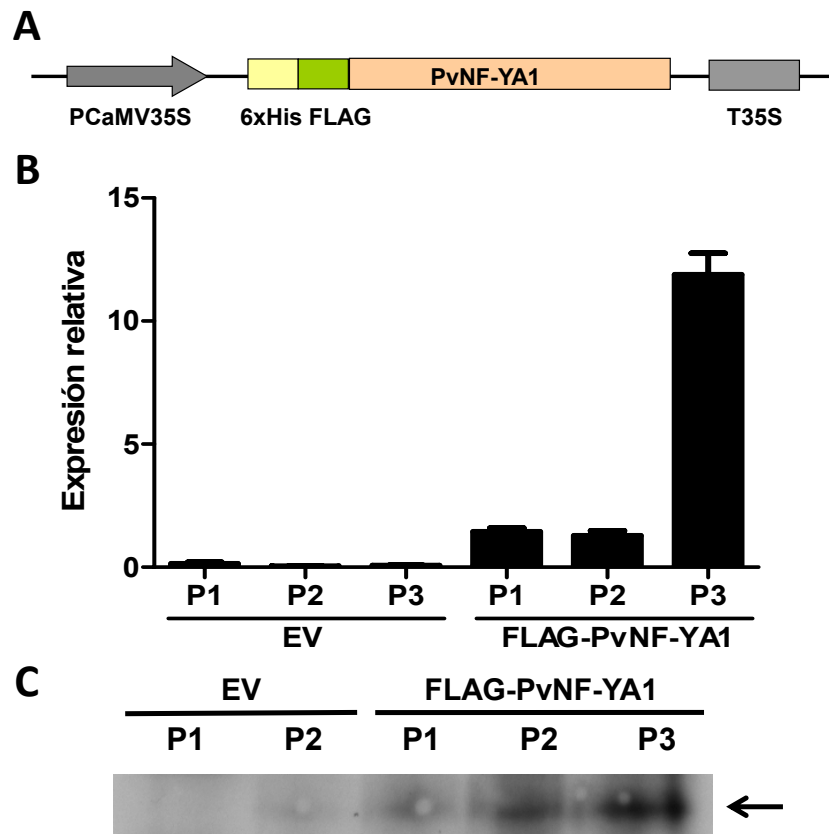


Figura 26. Sobreexpresión de PvNF-YA1 en raíces de *P. vulgaris*

A . Esquema de la construcción utilizada para sobreexpresar PvNF-YA1 fusionada al epítipo His-FLAG.

B . Niveles de mRNA de *PvNF-YA1* medidos por RT-qPCR en raíces de plantas independientes control (EV) o FLAG-PvNF-YA1. Las barras de error representan el desvío estándar de dos replicas técnicas. Pn: número de planta. PCaMV35S y t35S corresponden al promotor y terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor.

C . Análisis de WB con anticuerpo α -FLAG sobre extractos de raíces de plantas independientes EV y FLAG-PvNF-YA1. La banda observada en las tres últimas calles corresponde a la fusión FLAG-PvNF-YA1 de 38 KDa (flecha). Pn: número de planta.

5. Análisis del efecto de la sobreexpresión de PvNF-YA1 sobre la arquitectura de raíz y la simbiosis

En 2013, Soyano y colaboradores identificaron dos genes NF-Y de *L. japonicum* cuyos productos proteicos participan en la división celular. La sobreexpresión de *LjNF-YA1* y *LjNF-YB1* produjo una reducción de la distancia entre raíces laterales, y malformaciones en sus puntas (Soyano et al., 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes y el hecho de que el ensayo de expresión espacial de *PvNF-YA1* de la

Figura 23 mostró una leve expresión de este gen en la zona meristemática cercana al centro quiescente de las raíces laterales, se decidió evaluar la arquitectura de la raíz (Figura 27A) en plantas con niveles alterados de PvNF-YA1. El análisis fenotípico de las plantas compuestas reveló que la sobreexpresión de PvNF-YA1 no produjo efectos sobre la longitud de las raíces principales (Figura 27B) y laterales (Figura 27C). Tampoco se observaron malformaciones en las puntas de las raíces laterales. Por otro lado, las plantas que sobreexpresan *PvNF-YA1* mostraron un leve aumento en el número de raíces laterales desarrolladas por cm de raíz principal (densidad de las raíces laterales) en comparación con las plantas control, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 27D).

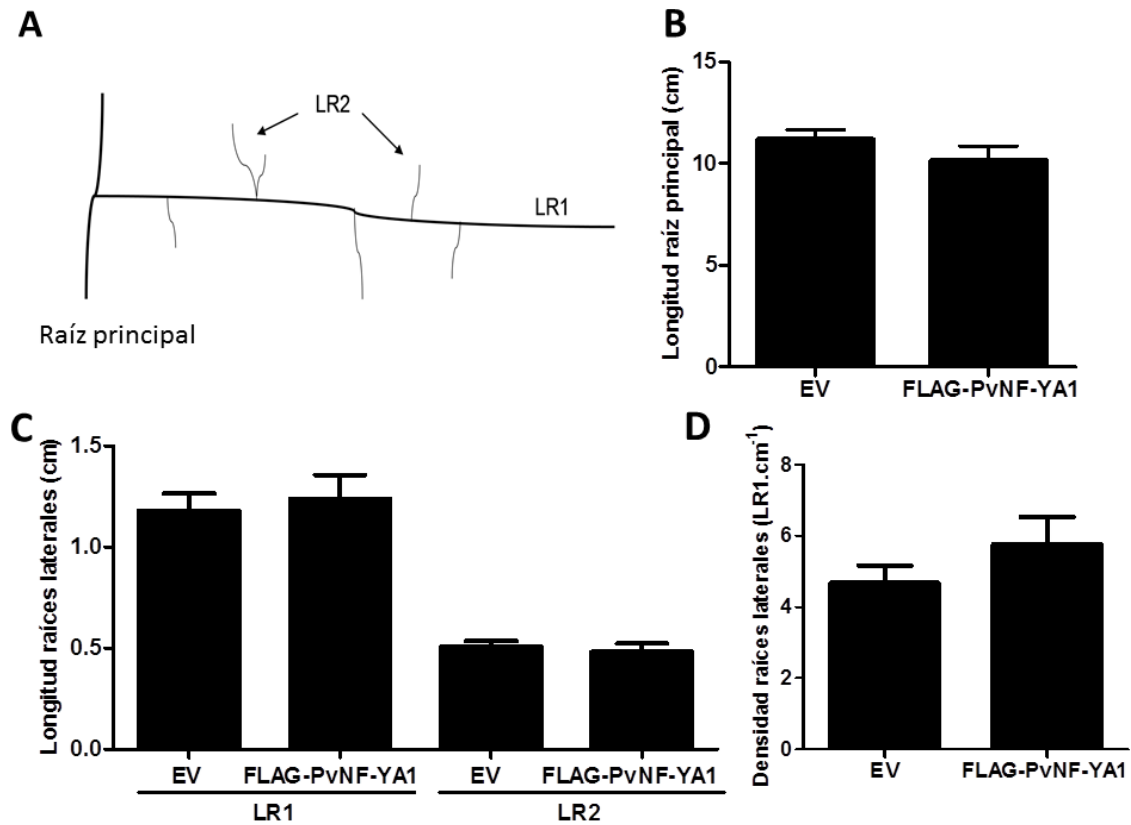


Figura 27. Efecto de la sobreexpresión de *PvNF-YA1* en el desarrollo radical.

A. Diagrama representativo de las raíces de *P. vulgaris*. La primera (LR1) y segunda ramificación (LR2) emergen de la raíz principal.

B y C. La longitud de la raíz principal (B), LR1 y LR2 (C) fue medida en raíces EV y FLAG-PvNF-YA1. Las diferencias no fueron significativas entre los valores de las plantas con niveles alterados de PvNF-YA1 y sus respectivos controles en un t-test con $P < 0,05$ ($n > 100$).

D. La densidad de LR1 fue medida en raíces EV y FLAG-PvNF-YA1. Las diferencias no fueron significativas en un t-test con $P < 0,05$ ($n < 50$).

Como se mencionó previamente, los niveles de mRNA de *PvNF-YA1* aumentan en la interacción más eficiente entre la variedad de poroto del centro de domesticación Mesoamericano y cepas de *R. etli* (alelo *nodC-α*) predominantes en suelos de esa región (Peltzer Meschini et al., 2008). Para analizar si *PvNF-YA1* podría estar relacionada con el reconocimiento específico de cepa, se llevaron a cabo inoculaciones utilizando cepas de *R. etli* SC15 (alelo *nodC-α*, cepa más eficiente) y 55N1 (alelo *nodC-δ*, cepa menos eficiente). El análisis fenotípico incluyó la cuantificación del número de nódulos formados en el tiempo en las raíces FLAG-*PvNF-YA1*, así como el peso seco de la parte aérea, y la cuantificación de números de IT desarrollados por cm de raíz. La inoculación con la cepa de *R. etli* de alta eficiencia SC15 no produjo diferencias significativas en el número de nódulos ni en el peso seco entre las plantas FLAG-*PvNF-YA1* y las control (Figura 28A y 28B, barras blancas). Esta misma tendencia se observó en el desarrollo de ITs por cm de raíz en estas plantas frente a la inoculación con otra cepa de *R. etli* de alta eficiencia marcada fluorescentemente, CFNX5 DsRed (Figura 28C). Por otro lado, la inoculación con la cepa de baja eficiencia 55N1 llevó a la formación de un número de nódulos significativamente mayor en raíces FLAG-*PvNF-YA1* comparadas con las control (Figura 28A, barras negras). Este aumento en el número de nódulos estuvo correlacionado con un aumento en el peso seco de la parte aérea de la planta, que se podría asociar a una mayor eficiencia de fijación de nitrógeno en las plantas FLAG-*PvNF-YA1* frente a la inoculación con 55N1 (Figura 28B, barras negras). Interesantemente, los niveles de nodulación y los pesos secos de las plantas que sobreexpresan *PvNF-YA1* inoculadas con 55N1 alcanzan valores comparables con aquellos medidos frente a la inoculación con SC15.

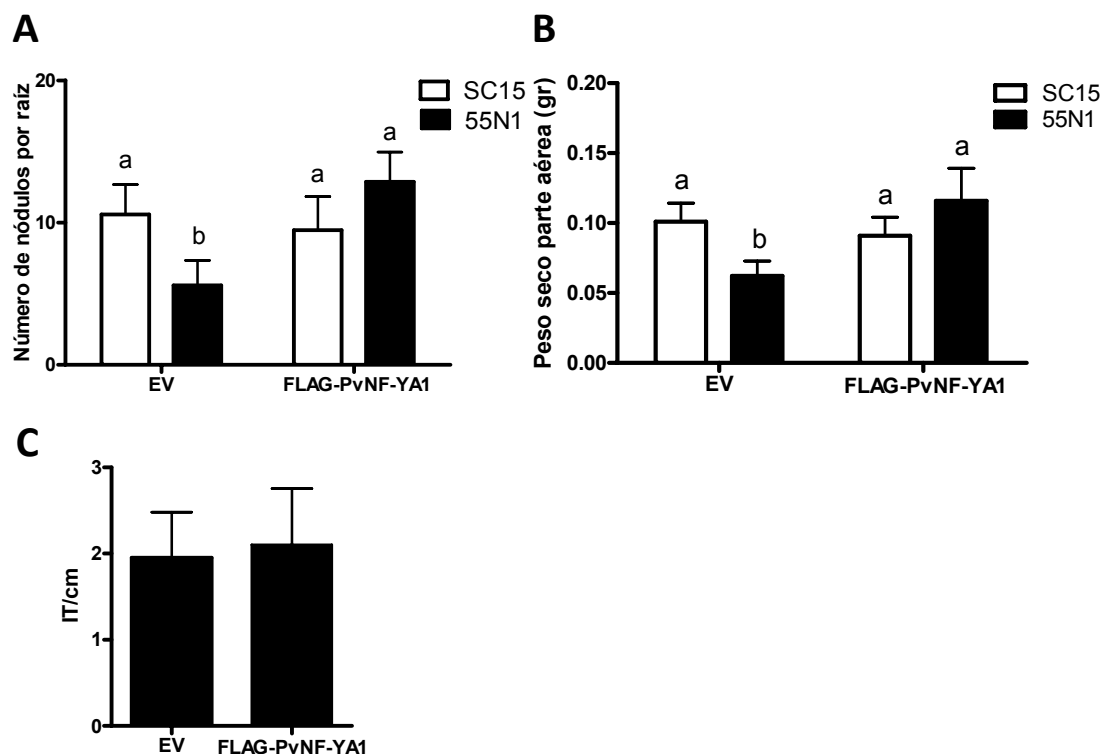


Figura 28. Efecto de la sobreexpresión de *PvNF-YA1* sobre la nodulación

A. Número de nódulos por raíz desarrollados en raíces EV o FLAG-PvNF-YA1 a los 10 dpi con cepas de *R. etli* SC15 (barras blancas) o 55N1 (barras negras). Las barras de error representan el SD del número de nódulos por raíz presentes en más de 50 raíces transgénicas independientes.

B. Peso seco del tejido aéreo de plantas compuestas EV o FLAG-PvNF-YA1 a los 21 dpi con cepas de *R. etli* SC15 ó 55N1. Las barras de error representan el SD de al menos diez plantas independientes. Letras diferentes indican valores significativamente diferentes en un t-test con $P < 0,05$. Los resultados son representativos de dos experimentos biológicos independientes.

C. El número de IT formados por centímetro de raíz en plantas compuestas EV y FLAG-PvNF-YA1 se cuantificó a los 5 dpi con una cepa de *R. etli* tipo α que expresa la proteína DsRed. Las diferencias no fueron significativas en un t-test $p < 0,05$ ($n > 40$).

Previamente, en nuestro laboratorio se describió que frente a la inoculación con una mezcla de cepas de *R. etli* SC15 y 55N1, las raíces de *P. vulgaris* de origen Mesoamericano desarrollan nódulos ocupados preferentemente por la cepa más eficiente SC15 (Aguilar et al., 2004). En función de estas observaciones previas y teniendo en cuenta que la sobreexpresión de *PvNF-YA1* afecta la interacción con la cepa menos eficiente 55N1, se procedió a evaluar la función de *PvNF-YA1* en la selección de cepas más eficientes. Para ello se realizaron experimentos de competencia inoculando plantas control y FLAG-PvNF-YA1 con una mezcla de las cepas de *R. etli* 55N1 y SC15. A los 21 dpi se recolectaron aproximadamente 100

nódulos por cada construcción, se aislaron las bacterias y se sembraron en placas conteniendo medio de crecimiento para rizobios (YEM-Rojo Congo, ver Materiales y Métodos sección 1.1). En una primera instancia las cepas de *R. etli* se identificaron en función de su color y aspecto de crecimiento en placa. Mientras que SC15 forma estrías rosa pálido y mucoides, 55N1 forma estrías de color rosa más intenso y no mucoides (Figura 29A). Posteriormente esta clasificación de las cepas de *R. etli* se confirmó mediante el análisis del polimorfismo del gen *nodC*: la cepa SC15 lleva el alelo *nodC* tipo α y la cepa 55N1 el tipo δ (Figura 29B). En este ensayo se observó que los nódulos de plantas control estaban ocupados en un 72 % por la cepa SC15 y un 28 % por la cepa 55N1. En contraste, los nódulos de plantas FLAG-PvNF-YA1 presentaron un incremento del 17 % de la ocupación de la cepa 55N1 respecto de las plantas control (Figura 29C). Estos resultados indican que la sobreexpresión de *PvNF-YA1* afecta la ocupación de nódulos descrita para esta variedad de *P. vulgaris*, aportando evidencia a favor del rol de *PvNF-YA1* en la preferencia de cepas por parte de la planta.

En conjunto, todos estos resultados son coincidentes con los observados previamente en nuestro laboratorio en plantas que sobreexpresaban *PvNF-YC1* (Zanetti et al., 2010), sugiriendo que un aumento en los niveles de *PvNF-YA1* y *PvNF-YC1* contribuyen a aumentar la capacidad simbiótica de los rizobios menos eficientes.

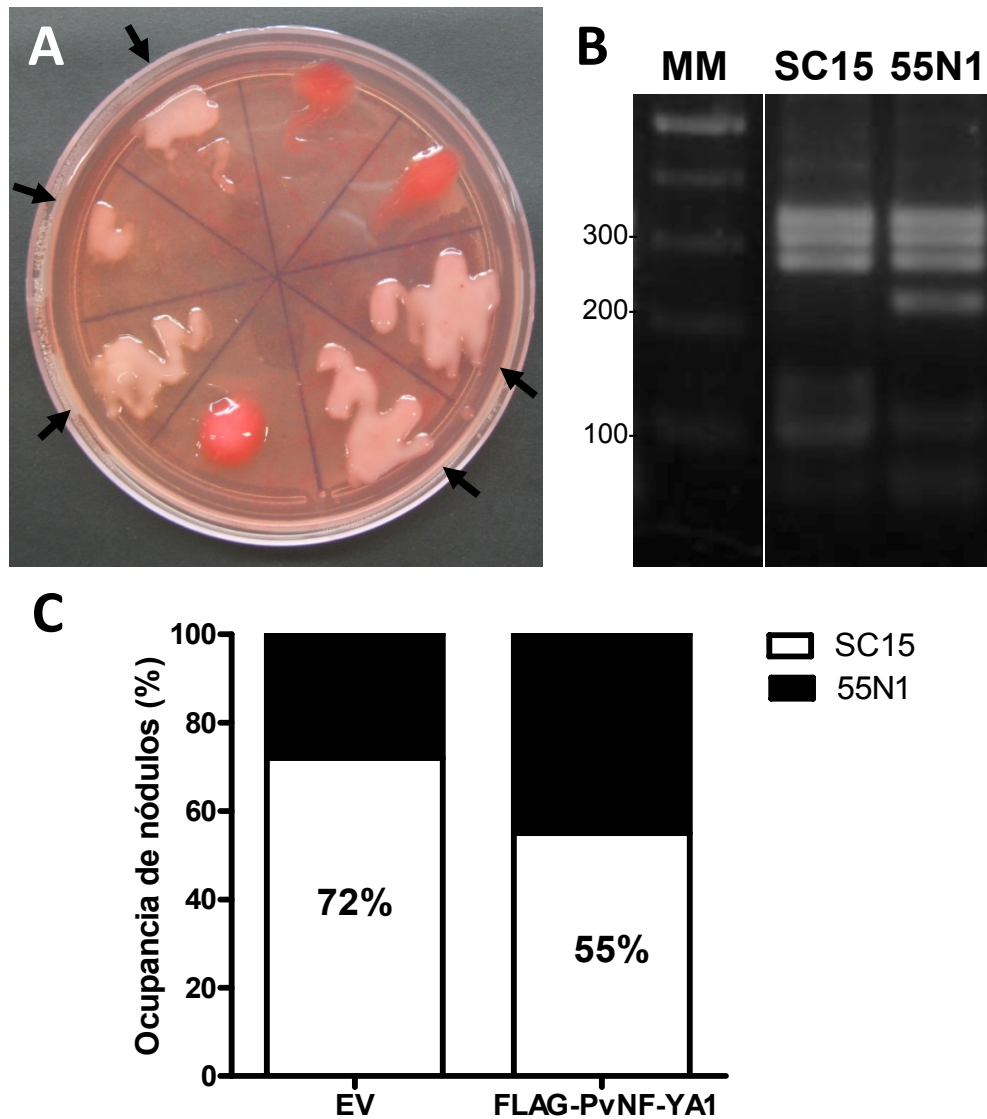


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de *PvNF-YA1* en la preferencia de cepa.

A. Diferencias en el color y aspecto del crecimiento en placas conteniendo medio YEM-RC de las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1. Las estrías rosa pálido y mucoides corresponden a la cepa SC15 (fechas negras) y las estrías rosa intenso y no mucoides a 55N1.

B. Perfiles polimórficos del gen *nodC* en las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1. El DNA se extrajo de cada cepa de *R. etli*. El fragmento del gen *nodC* se amplificó por PCR y se digirió con la enzima de restricción *HinfI*. Los fragmentos de restricción se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa. MM: marcador de peso molecular (100pb).

C. Porcentaje de ocupación de nódulos por cepas SC15 (blanco) y 55N1 (negro) en experimentos de coinoculación. El análisis se realizó a los 21 dpi con ambas cepas de rizobio, sobre un $n \geq 100$ nódulos, con un mínimo de 10 plantas coinoculadas para cada construcción.

6. Obtención de plantas compuestas con niveles reducidos de *PvNF-YA1/A9*

Como estrategia complementaria a la sobreexpresión, se decidió realizar el silenciamiento post-transcripcional de *PvNF-YA1* para estudiar su rol en la eficiencia de la nodulación frente a diferentes cepas de rizobios. *PvNF-YA1* comparte con *PvNF-YA9* un 75 % de identidad de secuencia a nivel de nucleótidos y ambos genes mostraron una marcada respuesta a tiempos tempranos frente a la inoculación con cepas de *R. etli* (ver Figura 19A). En particular, *PvNF-YA1* se indujo específicamente con la cepa más eficiente SC15, mientras que *PvNF-YA9* se indujo por ambas cepas, pero a mayores niveles con SC15. A su vez, Laloum y colaboradores demostraron que los ortólogos putativos de estos genes en *M. truncatula* presentan redundancia de función en la nodulación (Laloum et al., 2014). En función de estos antecedentes, y con el objetivo de caracterizar el rol de estos NF-Ys en la simbiosis *P. vulgaris*-*R. etli*, se utilizó una estrategia de RNAi para reducir simultáneamente los niveles de transcriptos de *PvNF-YA1* y de *PvNF-YA9* en raíces de *P. vulgaris* (Figura 30A). Para obtener la construcción *PvNF-YA* RNAi capaz de silenciar específicamente estos dos genes y no alterar la expresión del resto de los *PvNF-YA*, se utilizó para su diseño una parte de la región 3' UTR de *PvNF-YA1* con alta similitud de secuencia con la región 3' UTR de *PvNF-YA9* (Figura 30B). Para la construcción control se utilizaron secuencias del gen *GUS* como repeticiones invertidas en lugar de *PvNF-YA*. Como en el caso de la sobreexpresión, los vectores utilizados en las construcciones de RNAi expresan la proteína fluorescente verde eGFP, lo que nos permitió seleccionar las raíces transgénicas que expresan la construcción de interés. Se observó fluorescencia en aproximadamente el 90 % de las raíces, confirmando una alta eficiencia de transformación (Figura 30C).

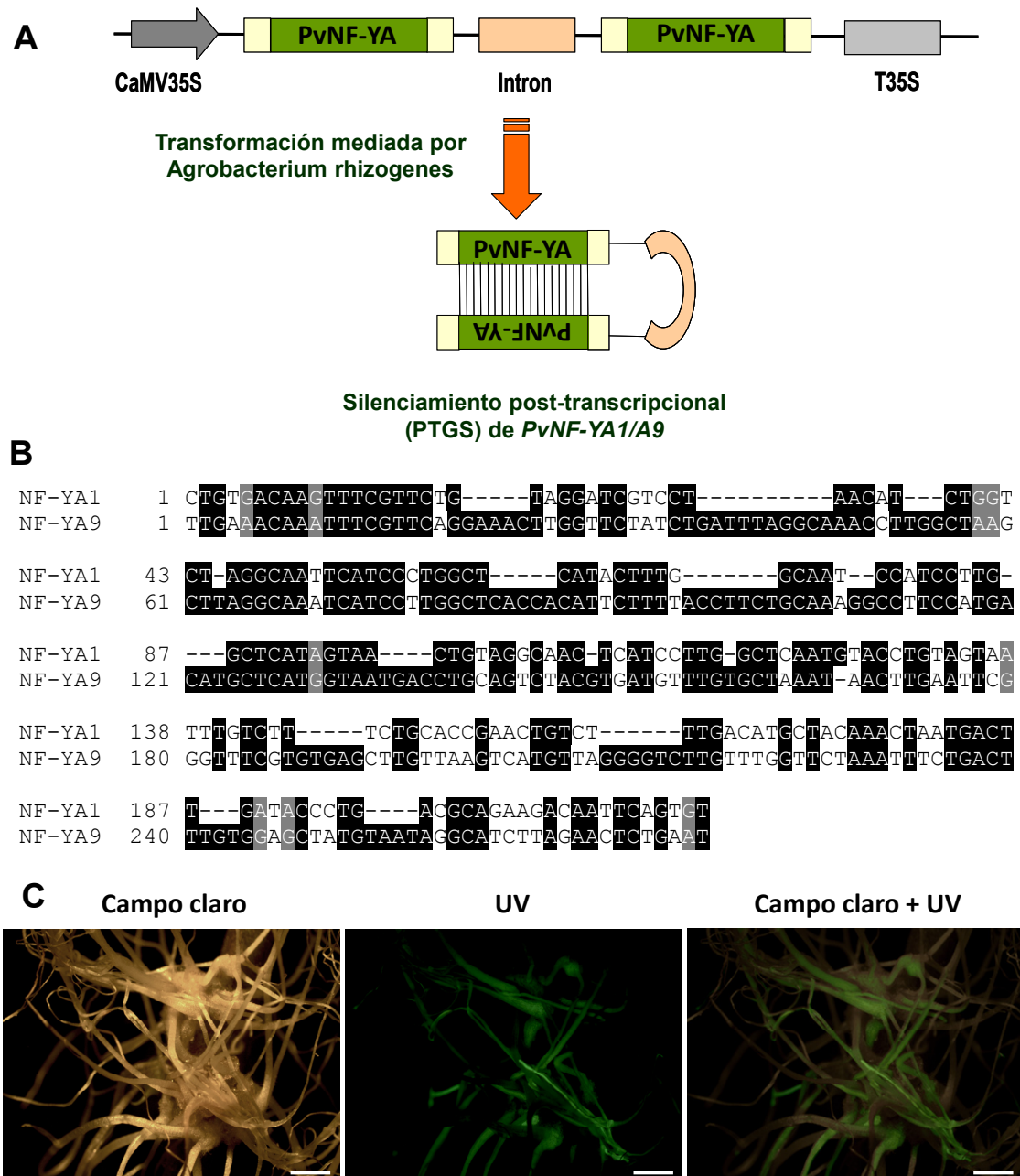


Figura 30. Silenciamiento de *PvNF-YA1/9*

A. Esquema de la construcción diseñada para el silenciamiento específico de *PvNF-YA1/9* mediado por RNAi. PCaMV35S y t35S corresponden al promotor y terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor.

B. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento de *PvNF-YA1* utilizada para el diseño de la construcción RNAi con la secuencia correspondiente de nucleótidos de *PvNF-YA9*. Esta región de *PvNF-YA1* muestra un 58 % de identidad a nivel de nucleótidos con *PvNF-YA9*. Las secuencias fueron alineadas utilizando CLUSTAL W y el alineamiento fue formateado con BOXSHADE. Las cajas negras corresponden a residuos idénticos y las grises indican sustituciones conservativas.

C. Raíces transformadas con la construcción *PvNF-YA* RNAi observadas bajo luz visible (campo claro) o UV a los 15 días luego de la transformación. Las barras de escala corresponden a 1cm.

Para verificar la efectividad del silenciamiento causado por la construcción *PvNF-YA1/9* RNAi se determinaron los niveles de mRNA de *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* en raíces de tres plantas compuestas *PvNF-YA* RNAi. Las raíces que expresan el RNAi para *PvNF-YA1/9* mostraron una reducción de ~80 % en niveles de transcritos *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* comparado con las plantas control, que expresan la construcción *GUS* RNAi (Figura 31A). A su vez, la expresión del resto de los miembros de la familia no se vio alterada por la estrategia de silenciamiento (Figura 31B), permitiendo concluir que la construcción RNAi diseñada silencia efectiva y específicamente a *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9*.

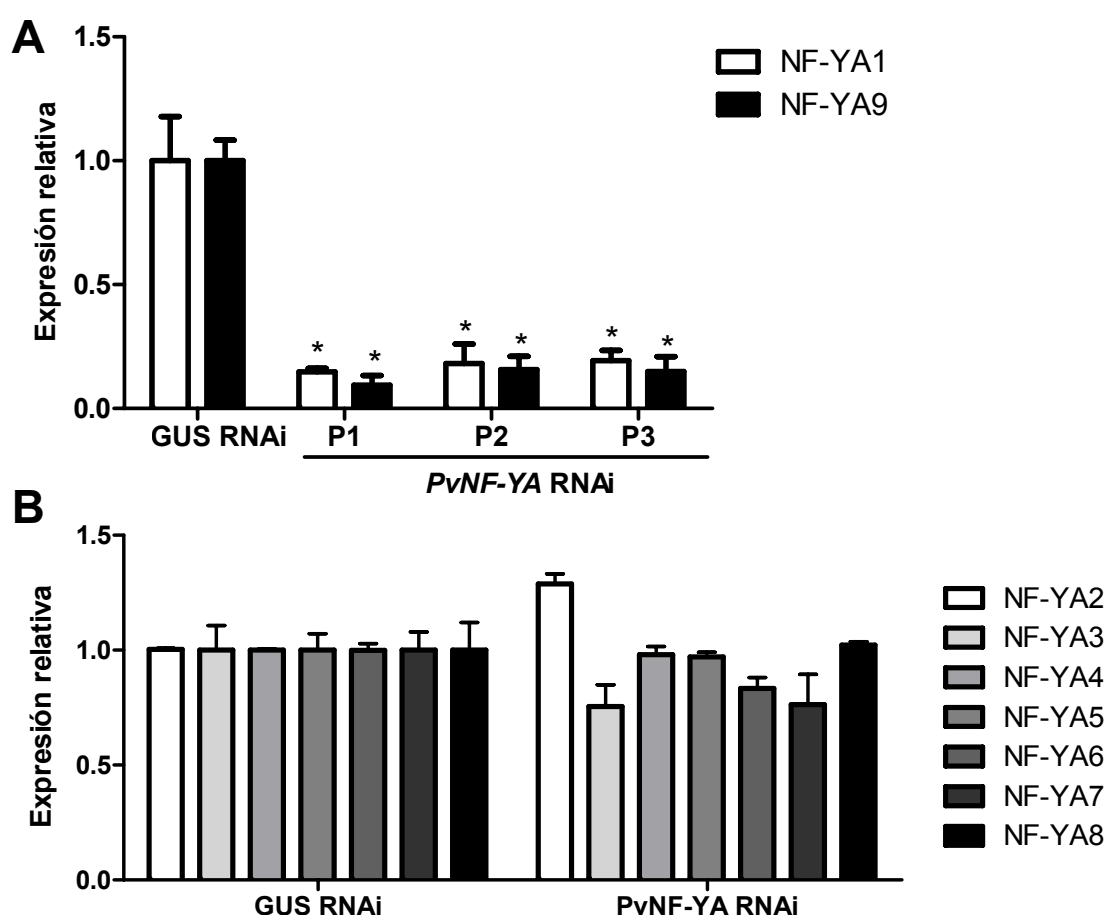


Figura 31. Silenciamiento específico de *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9*

Análisis por RT-qPCR de los niveles de mRNA de **(A)** *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* en raíces transgénicas *GUS* RNAi (control) y tres raíces *PvNF-YA* RNAi independientes y **(B)** del resto de los NF-YAs en plantas control y plantas *PvNF-YA* RNAi. Los datos de expresión fueron normalizados usando los datos de expresión del gen *eEF1α* y se presentan en relación a las raíces control. Los resultados son la media de dos repeticiones técnicas y representativos de dos experimentos independientes. Las barras de error representan la SD. Los asteriscos indican diferencias significativas en un t-test con $p < 0,05$ comparando los valores de cada gen en cada planta *PvNF-YA* RNAi con el control *GUS* RNAi.

7. Evaluación del efecto del silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* sobre la arquitectura de raíz, la organogénesis del nódulo y la infección por *R. etli*

El análisis fenotípico de las raíces de plantas compuestas mostró que el silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* no afectó el desarrollo del sistema radical. La expresión de la construcción *PvNF-YA RNAi* no alteró la longitud de las raíces laterales (Figura 32A) ni principales (Figura 32B), ni tampoco produjo un efecto estadísticamente significativo sobre la densidad de raíces laterales (Figura 32C).

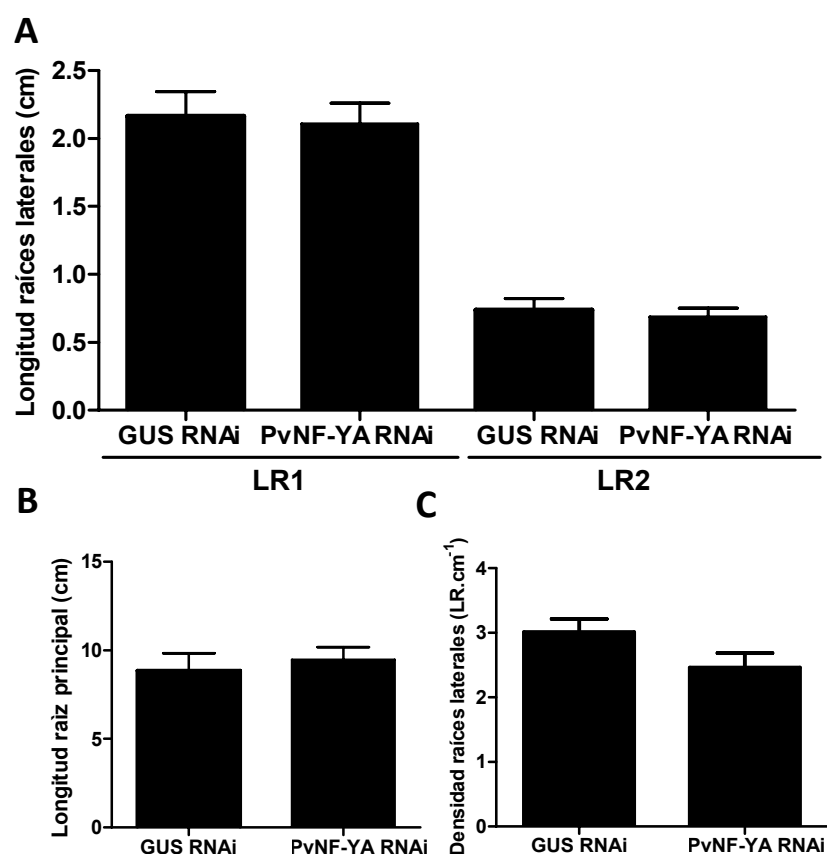


Figura 32. El silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* no altera la arquitectura de raíz en *P. vulgaris*.

A y B. La longitud de las raíces laterales (LR1 y LR2) (**A**) y la raíz principal (**B**) fué medida en raíces *GUS RNAi* y *PvNF-YA RNAi*. Las diferencias no fueron significativas entre los valores de las plantas con niveles alterados de *PvNF-YA1/A9* y las control en un t-test de *Student* con $P < 0.05$ ($n > 100$).

C. La densidad de LR1 (número de raíces laterales primarias por cm de raíz principal) fue medida en raíces *GUS RNAi* y *PvNF-YA RNAi*. Las diferencias no fueron significativas en un t-test de *Student* con $P < 0.05$ ($n > 50$).

Con el fin de investigar el rol de *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* durante la simbiosis se evaluó el efecto de su silenciamiento sobre la formación de nódulos. Como se muestra en la Figura 33A, las plantas *PvNF-YA* RNAi no desarrollaron nódulos luego de la inoculación con diferentes cepas de *R. etli*, mientras que las plantas control (*GUS* RNAi) formaron un mayor número de nódulos con la cepa más eficiente SC15 que con la cepa menos eficiente 55N1, tal como se había descripto previamente (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010). Este resultado se observó consistentemente en cuatro experimentos independientes. Interesantemente, en solo uno de estos experimentos se observó la formación de dos nódulos inmaduros o *bumps* formados en una de las raíces *PvNF-YA* RNAi fluorescentes inoculada con la cepa SC15 (Figura 33B, segundo panel). En la Figura 33B (paneles superior e inferior) se muestran los nódulos desarrollados en las raíces no transgénicas (raíces no fluorescentes) correspondientes a las plantas *PvNF-YA* RNAi y la ausencia de nódulos en las raíces fluorescentes que expresan la construcción *PvNF-YA* RNAi. En resumen, estos resultados sugieren que los genes *PvNF-YA1* y/o *PvNF-YA9* serían requeridos para la formación de nódulos.

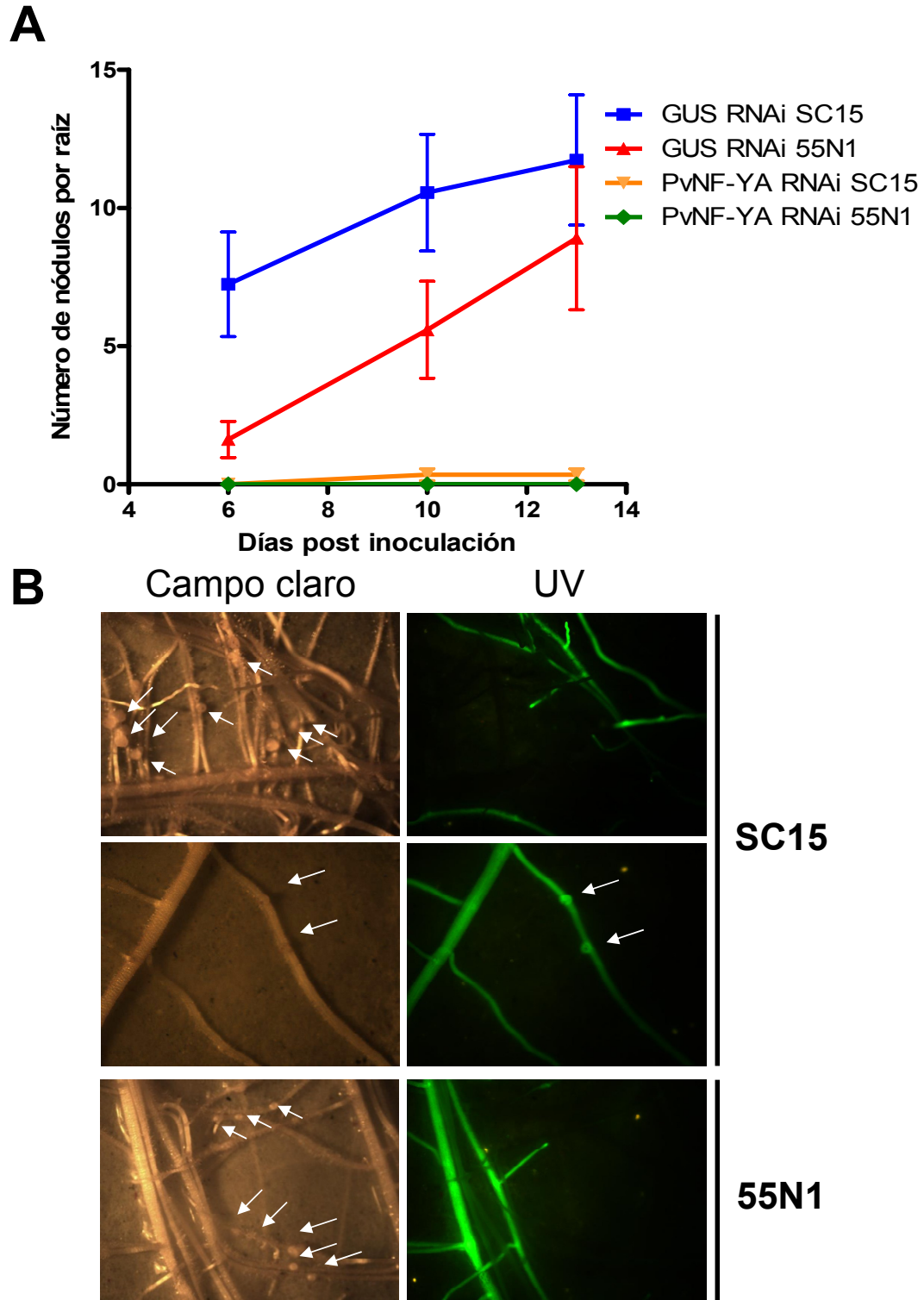


Figura 33. Efecto del silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* en la nodulación.

A. Número de nódulos formados por raíz en plantas compuestas *GUS* RNAi (control) y *PvNF-YA* RNAi frente a la inoculación con las cepas de *R. etli* SC15 y 55N1. Las barras de error representan los SD. El experimento es representativo de cuatro réplicas biológicas independientes (n>60 para cada condición).

B. Fotos ilustrando la presencia de nódulos en las raíces no fluorescentes de plantas transformadas con la construcción *PvNF-YA* RNAi y la ausencia de los mismos en la mayoría de las raíces fluorescentes. Las flechas marcan la presencia de dos primordio de nódulos o *bumps*. Las fotografías fueron tomadas a los 10 dpi con las cepas SC15 ó 55N1.

La disponibilidad de cepas de rizobios que expresan marcadores fluorescentes permitió evaluar el número de ITs formados, así como también su progresión hacia las células corticales y su liberación en los simbiosomas mediante microscopía de fluorescencia. La expresión de *PvNF-YA* RNAi en raíces de *P. vulgaris* produjo una reducción significativa en la densidad de hilos de infección en raíces fluorescentes (Figura 34A). En las plantas control, la mayoría de los ITs observados progresaron hasta alcanzar las células del córtex, donde las bacterias fueron liberadas. Por el contrario, los pocos ITs observados en las plantas *PvNF-YA* RNAi abortaron en el pelo radical o la epidermis (Figura 34B y 34C). Estos resultados sugieren que *PvNF-YA1* y/o *PvNF-YA9* serían requeridos tanto para la iniciación como para la progresión de los eventos de infección rizobiana.

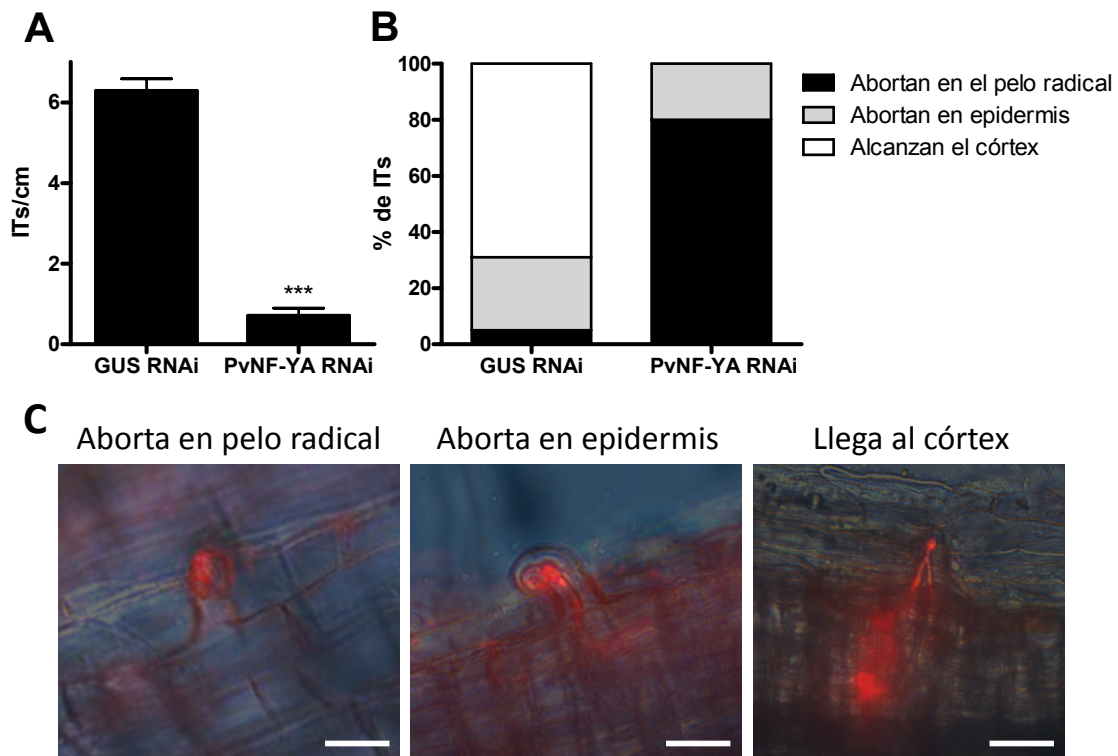


Figura 34. Efecto del silenciamiento de *PvNF-YA1/9* en la infección por el rizobio.

A. El número de ITs formados por centímetro de raíz en plantas compuestas *GUS* y *PvNF-YA* RNAi se cuantificó a los 5 dpi con una cepa *R. etli* que expresa la proteína DsRed. Los asteriscos indican diferencias significativas en un t-test con $P < 0,05$ ($n > 40$).

B. Los ITs formados fueron clasificados como eventos que alcanzan el córtex (barras blancas), la epidermis (barras grises) o que abortan en el pelo radical (barras negras) y expresados como porcentaje del total. El número de ITs que abortan en el pelo o en la epidermis fueron significativamente mayores en las plantas *PvNF-YA* RNAi que en las *GUS* RNAi en un t-test con $P < 0,05$, mientras que no se registraron eventos que alcancen el córtex en plantas *PvNF-YA* RNAi.

C. Imágenes de ITs que abortan en el pelo radical, en las células epidérmicas y que alcanzan las células corticales de raíces *GUS* RNAi correspondientes a las categorías cuantificadas en B.

8. Efecto del silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular

El fenotipo observado en las plantas silenciadas y el hecho de que *PvNF-YA1/A9* forman parte de un complejo transcripcional sugieren que estas proteínas podrían actuar en la regulación de genes involucrados en la nodulación, conocidos como nodulinas (Soyano and Hayashi, 2014). Con el fin de estudiar si *PvNF-YA1/A9* son requeridos para la activación de respuestas moleculares tempranas de leguminosas frente a la infección por los rizobios, se analizó la expresión de las siguientes nodulinas: *ERN1*, un factor de transcripción de tipo AP2 que es requerido para la formación del IT y la invasión del nódulo (Middleton et al., 2007) y *ENOD40*, que codifica un RNA implicado en la formación del primordio de nódulo (Crespi et al., 1994). Previamente se demostró que los transcritos de estos genes se acumulaban en raíces de poroto salvajes frente a la inoculación con ambas cepas de *R. etli*, SC15 y 55N1, pero en el caso de *ERN1*, los niveles de transcritos fueron superiores en raíces inoculadas con SC15 que con 55N1 (Zanetti et al., 2010). De igual manera, hubo un aumento en los niveles de transcritos de estos genes a las 24 hpi con SC15 en las plantas *GUS RNAi* (Figura 35, barras blancas); sin embargo, el silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* afectó negativamente la expresión de estas nodulinas en respuesta al rizobio (Figura 35, barras negras). Estos resultados sugieren que estas subunidades regularían de manera directa o indirecta la expresión de *ERN1* y *ENOD40* en respuesta al rizobio.

En mamíferos, los NF-Y regulan la expresión de genes involucrados en el control de la progresión del ciclo celular, como por ejemplo *CDC2* y *ciclina B* (Caretto et al., 2003). En el contexto de la nodulación, se ha demostrado que algunos de estos genes son activados a tiempos tempranos de la inoculación con rizobios, y a su vez, se sabe que *PvNF-YC1* promueve directa o indirectamente la expresión de estos genes durante el establecimiento de la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli* (Zanetti et al., 2010). Por lo

tanto se evaluó si el silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* también afectaba la expresión de los genes de ciclo celular. Como se observa en la Figura 35, el silenciamiento de estas subunidades también produjo una reducción de *CDC2* y *CycB* en las raíces *PvNF-YA* RNAi inoculadas (barras negras) en comparación con las *GUS* RNAi (barras blancas), sugiriendo un posible rol de *PvNF-YA1* y/o *PvNF-YA9* en la iniciación de la organogénesis del nódulo, la cual requiere una activa división celular.

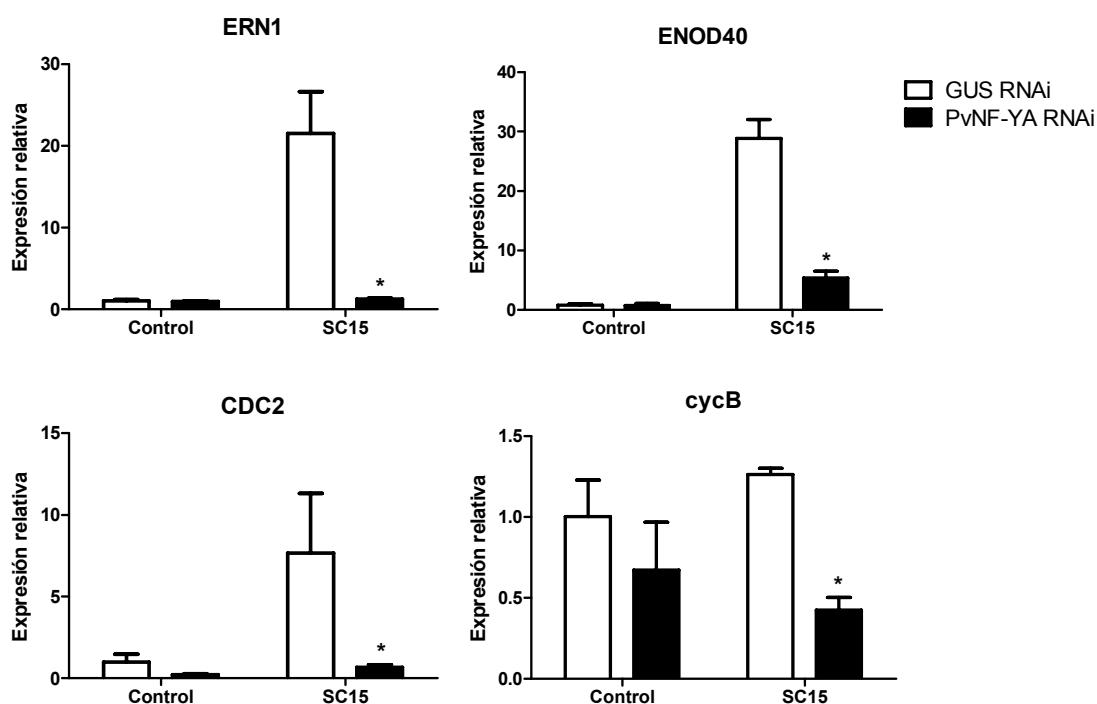


Figura 35. Efecto del silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular. Raíces que expresan *GUS* (barras blancas) o *PvNF-YA* RNAi (barras negras) fueron inoculados con la cepa *R. etli* SC15. El tejido fue colectado a las 24 hpi. Los controles fueron tratados con medio de crecimiento para rizobios (YEM) durante 24 h (control). La expresión de los genes indicados se determinó mediante RT-qPCR. Los valores fueron normalizados con los valores de expresión de *PvEF1α*, y presentados en relación a los valores de las raíces control de *GUS* RNAi. Los datos son la media de dos repeticiones técnicas. Las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican que los valores de expresión en *PvNF-YA* RNAi son significativamente diferentes de los de raíces *GUS* RNAi, en un t-test con $P < 0,01$.

Capítulo II - Discusión

PvNF-YA1 y/o PvNF-YA9 participan en la infección bacteriana y en la organogénesis del nódulo

Como se mencionó previamente, en respuesta a la presencia del rizobio se activa una vía de transducción de señal que resulta finalmente en la activación de diversos factores de transcripción, tanto en las células epidérmicas como corticales de las raíces de plantas leguminosas. Estos reguladores proteicos reconocen y se unen a secuencias específicas del DNA situadas en el promotor de ciertos genes, y así son capaces de controlar la actividad génica en respuesta al rizobio. A pesar de que varios factores de transcripción se identificaron por su capacidad de unirse a promotores de nodulinas, los avances más significativos han surgido de enfoques genéticos por clonación posicional de genes cuya mutación altera la infección rizobiana o el desarrollo de nódulos. El primer factor de transcripción clonado de esta manera fue NIN (Schauser et al., 1999). Otros, como ERN1 y ERN2 (Middleton et al., 2007; Cerri et al., 2012), CYCLOPS (Singh et al., 2014), NSP1 y NSP2 (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005), MtNF-YA1 (Combiér et al., 2006) y PvNF-YC1 (Zanetti et al., 2010) fueron posteriormente añadidos a la lista. Los últimos pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales tipo NF-Y y fueron objeto de estudio en este segundo capítulo de la tesis.

A partir del análisis de expresión desarrollado en el Capítulo I surgieron dos miembros de la familia PvNF-YA, *PvNF-YA1* y *-YA9*, que se expresan altamente en nódulos en comparación con otros tejidos (Figura 16). En este capítulo, las subunidades *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* fueron caracterizadas durante diferentes etapas de la asociación simbiótica entre *P. vulgaris* y *R. etli*, mediante ensayos de RNAi. La expresión de la

construcción *PvNF-YA* RNAi, capaz de silenciar específicamente a *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9*, produjo un efecto drástico sobre la nodulación. De hecho, el silenciamiento de estos dos genes impidió que las plantas silenciadas desarrollaran nódulos frente a la inoculación con diferentes cepas de rizobios y también provocó una reducción del número de ITs y un aumento en el porcentaje de ITs incapaces de llegar a la células corticales, ya que en su mayoría abortaban en el estadio de microcolonia, previo a la iniciación del IT. En concordancia con esto, el silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* también produjo una severa disminución en la activación transcripcional de las nodulinas tempranas *ERN1* y *ENOD40* en respuesta a la inoculación con SC15, por lo tanto estos resultados sugieren un rol potencial de *PvNF-YA1/A9* en la organogénesis del nódulo e iniciación de la infección rizobiana. Esta doble función en simbiosis ha sido previamente reportada para otros NF-Ys (Zanetti et al., 2010; Laloum et al., 2014) y también para otras familias de factores de transcripción como NIN, NSP1 y NSP2 (Hayashi et al., 2010; Madsen et al., 2010). Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que la organogénesis del primordio de nódulo sea el principal evento afectado, y que la infección se bloquee como consecuencia de la falta de divisiones celulares corticales iniciales, condición previamente descrita como necesaria para el desarrollo de nódulos determinados e indeterminados (Gonzalez-Rizzo et al., 2006; Madsen et al., 2010). Estas divisiones corticales en nódulos determinados están acompañadas de la inducción transitoria de genes del ciclo celular en las primeras etapas de la formación del nódulo. Raíces de *P. vulgaris* con niveles reducidos de *PvNF-YA1//YA9* mostraron una menor inducción de expresión de *ciclina B* y *cdc2*, ya que no se observó el aumento esperado en sus niveles de transcritos a las 24 hpi con SC15 (Figura 35), sugiriendo un posible rol de *PvNF-YA1* y/o *PvNF-YA9* en la reactivación de las divisiones celulares corticales necesarias para la iniciación del primordio de nódulo en *P. vulgaris*.

Las proteínas *PvNF-YA1* y *PvNF-YA9* se encuentran estrechamente relacionadas a nivel filogenético con los productos de los genes *MtNF-YA2* y *MtNF-YA1*

respectivamente, y al producto del gen *LjNF-YA1* (ver Figura 15), los cuales son necesarios para el desarrollo de nódulos de tipo indeterminados y determinados en *M. truncatula* y *L. japonicus*, respectivamente (Combier et al., 2006; Combier et al., 2008; Soyano et al., 2013). Además, *MtNF-YA1* y *MtNF-YA2* son requeridos para la infección bacteriana y la inducción de las nodulinas tempranas ERN1 y ENOD11 (Laloum et al., 2014; Laporte et al., 2014). Si bien en raíces de *L. japonicus* la disminución de los niveles de mRNAs de *LjNF-YA1* no alteró el número de eventos de infección, esto podría deberse a que otros miembros de la familia NF-Y podrían cumplir funciones redundantes con *LjNF-YA1*, tal como se observó en *M. truncatula*. En conjuntos, estas evidencias sugieren que estos genes *NF-YA* podrían tener funciones semejantes en estas tres leguminosas.

PvNF-YA1 forma un complejo estable con PvNF-YC1

Los mecanismos de formación del heterotrímero NF-Y han sido bien descritos en mamíferos (Mantovani, 1999) y, más recientemente, trabajos realizados en plantas revelaron la conservación entre los dos reinos (Calvenzani et al., 2012; Hackenberg et al., 2012). A diferencia de trabajos publicados anteriormente que muestran la interacción entre subunidades NF-YA y NF-YC (Thirumurugan et al., 2008; Soyano et al., 2013), nosotros no fuimos capaces de mostrar la interacción entre PvNF-YA1 y PvNF-YC1 mediante BiFC. Debido a la aparente inespecificidad de interacción entre las subunidades NF-YB y NF-YC (Calvenzani et al., 2012), probablemente las subunidades testeadas en estos estudios fueron capaces de formar dímeros NF-YB/NF-YC con las proteínas endógenas del sistema de expresión utilizado (levaduras o *N. benthamiana*) permitiendo de este modo la interacción con la subunidad NF-YA. Sin embargo, la formación de complejos entre las subunidades NF-Y de diferentes organismos no siempre es óptima y la estequiometría del trímero podría verse afectada cuando se

utilizan proteínas heterólogas en los ensayos. Esto podría explicar por qué no fue posible corroborar la interacción entre PvNF-YA1 y PvNF-YC1 en *N. benthamiana*. Posteriormente, mediante ensayos de ColP expresando en forma conjunta las tres subunidades fue posible confirmar la formación *in planta* de un trímero NF-Y estable entre PvNF-YA1, PvNF-YC1 y PvNF-YB7. Este resultado y las funciones descriptas para PvNF-YA1 en este trabajo y PvNF-YC1 (Zanetti et al., 2010) en la nodulación, permiten suponer que estas dos subunidades podrían estar formando parte de un mismo complejo NF-Y funcional durante la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli*. En concordancia con esto, recientemente se ha demostrado que los ortólogos putativos de PvNF-YA1 y PvNF-YC1 en *M. truncatula*, forman un heterotrímero estable *in planta* (Baudin et al., 2015), lo que sugiere la existencia de complejos NF-Y conservados evolutivamente para controlar la nodulación en plantas leguminosas.

PvNF-YA1 participa en la especificidad de cepa

La organogénesis del nódulo es un proceso complejo y coordinado con el proceso de infección que comienza en la epidermis y depende de un continuo intercambio de señales entre la planta y el rizobio. El NF cumple un papel fundamental en regular ambos procesos y determina la especificidad de la interacción. Además del NF, ciertos polisacáridos de superficie (EPS y LPS) son necesarios para una correcta infección de las células corticales (Oldroyd, 2013). La discriminación entre diferentes especies de rizobios comienza a establecerse en la rizósfera (Simms and Taylor, 2002), donde la planta tiene un rol activo en seleccionar y establecer simbiosis más eficientes que han sido favorecidas por coevolución (Aguilar et al., 2004).

En base a resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Peltzer Meschini et al., 2008; Zanetti et al., 2010), se ha propuesto un modelo que permite relacionar el dialogo molecular establecido en etapas tempranas con la capacidad de la planta de

seleccionar bacterias más eficientes y mejores competidoras. En este modelo, cuando se inocula la variedad Mesoamericana de *P. vulgaris* con cepas de *R. etli* de la misma región geográfica, se activa RabA2, una GTPasa monomérica requerida para las etapas de pre-infección durante la simbiosis (Blanco et al., 2009). Esta GTPasa es necesaria para la inducción del gen *PvNF-YC1*, cuyo producto activa, directa o indirectamente, la transcripción de genes del ciclo celular para iniciar el desarrollo del primordio de nódulo (Zanetti et al., 2010). En contraste, las cepas de *R. etli* que predominan en la región Andina no inducen en estos cultivares Mesoamericanos altos niveles de expresión de *RabA2*, y por ende de *PvNF-YC1*. Como consecuencia, la infección por estas cepas de *R. etli* y la posterior formación del primordio de nódulo se encuentran retrasados, resultando en interacciones menos competitivas. Considerando que el número de nódulos desarrollados por una planta es regulado por un mecanismo de *feedback* o retroalimentación negativa (autorregulación de la nodulación), las cepas que inician rápidamente la infección y organogénesis del nódulo son más competitivas debido a que aceleran el proceso de infección y ocupancia del nódulo (Oka-Kira et al., 2005) (Figura 36). En el presente trabajo, la sobreexpresión de *PvNF-YA1* produjo un aumento de la capacidad simbiótica de la cepa de *R. etli* menos eficiente 55N1, y sumado al hecho de que los niveles de transcritos de *PvNF-YA1* aumentan a tiempos tempranos exclusivamente luego de la inoculación con la cepa más eficiente SC15 (Figura 19) y se mantienen a mayores niveles en nódulos de 7 y 14 dpi formados por esta misma cepa, en comparación con aquellos formados por 55N1 (Figura 16), estos resultados sustentan la hipótesis de que este factor de transcripción cumpliría un rol en la respuesta de la planta en las interacciones simbióticas más eficientes (Figura 36). El hecho de que *PvNF-YA1* y *PvNF-YC1* sean capaces de formar un complejo NF-Y estable (Figura 25) nos permite hipotetizar que estas dos subunidades podrían estar participando en el establecimiento de simbiosis más eficientes dentro del mismo complejo heterotrimérico.

Considerando que la disponibilidad de nitrógeno es una de las mayores limitaciones para el crecimiento de la planta, la optimización de la compatibilidad entre leguminosas y rizobios es necesaria para mejorar la productividad de los cultivos. El modelo propuesto permite explicar, al menos de forma parcial, algunos componentes del programa genético que determina la compatibilidad funcional en interacciones simbióticas. El conocimiento de estos mecanismos será clave para desarrollar estrategias que permitan mejorar la capacidad de la planta de seleccionar aquellas cepas más eficientes en la fijación de nitrógeno, pero que son buenos competidores en el proceso de infección u ocupación de nódulo.

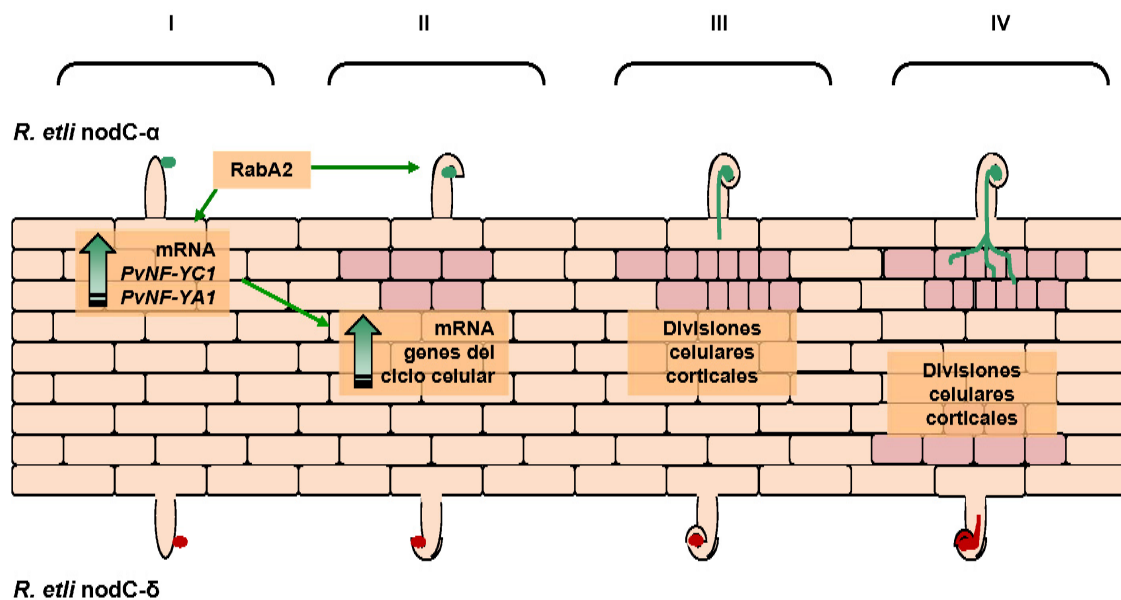


Figura 36. Modelo de organogénesis del nódulo y competencia en la interacción simbiótica *P. vulgaris*-*R. etli*.

En la sección superior de la raíz de plantas de origen mesoamericano se representa la asociación más eficiente cepas de *R. etli* portadoras del alelo *nodC-α*, mientras que la interacción menos eficiente establecida con las cepas de *R. etli* portadoras del alelo *nodC-δ* se encuentra representada en la sección inferior. La activación de la GTPasa RabA2 por cepas de *R. etli nodC-α* induce la expresión de *PvNF-YC1*. En función de los resultados obtenidos en esta tesis, también podemos incluir a *PvNF-YA1* como otro gen que se induce a tiempos tempranos de la infección (Estadio I). Tanto *PvNF-YA1* como *PvNF-YC1* activa la expresión de genes del ciclo celular (Estadio II), y como consecuencia inician las divisiones celulares corticales (Estadio III). La infección establecida por cepas de *R. etli nodC-α* alcanza el primordio de nódulo (Estadio IV) más rápidamente que las cepas *nodC-δ* (incapaces de inducir *PvNF-YC1* y *PvNF-YA1*). La efectividad en la infección resulta en una ventaja competitiva cuando las dos cepas están presentes en el suelo.

CAPÍTULO III

Resultados y discusión

Capítulo III – Caracterización fenotípica de SIN1, una proteína tipo GRAS que interactúa con PvNF-YC1

Como se mencionó en la introducción, en nuestro laboratorio se llevó a cabo un *screening* de doble híbrido de levaduras utilizando PvNF-YC1 como carnada (*bait*) y una biblioteca de cDNA de raíces de poroto inoculadas con *R. etli* (*prey*) con el fin de identificar proteínas capaces de interactuar con PvNF-YC1. Durante el desarrollo de esta tesis se decidió abordar la caracterización de uno de los 8 clones obtenidos, SIN1, el cual presentó alta similitud de secuencia con proteínas de la familia GRAS según una búsqueda en la base de datos GeneBank utilizando el algoritmo BLASTX.

1. Confirmación de la interacción entre SIN1 y PvNF-YC1

El cDNA parcial de SIN1 aislado en el ensayo de doble híbrido de levadura corresponde a una porción del dominio GRAS que contiene un dominio rico en leucina y mitad del motivo PFYRE (prolina-fenilalanina-tirosina-arginina-glutamato). Para verificar la interacción entre las proteínas SIN1 y PvNF-YC1 se realizó un ensayo retransformando las levaduras con la secuencia completa de cada ORF fusionadas a los dominios de activación transcripcional (AD) y de unión a DNA (BD), respectivamente. El crecimiento en medio selectivo y las determinaciones de la actividad β -galactosidasa permitieron verificar la interacción entre las proteínas completas en levadura (Figura 37). La delección del extremo amino (N)- o carboxilo (C)-terminal de PvNF-YC1 (Figura 37A) produjo una reducción de la actividad β -galactosidasa de aproximadamente 68% en ambos casos en relación a la proteína completa (Figuras 37B y C). Por otro lado, la expresión de la región central de PvNF-

YC1, la cual alberga los motivos conservados HFD requeridos para la unión al DNA y la interacción con las subunidades A y B del complejo NF-Y, no fue suficiente para interactuar con SIN1. Este resultado indica que la región central de PvNF-YC1 por sí sola no sería suficiente para la interacción con SIN1, y que las regiones N y C terminal también serían requeridas para la interacción con SIN1.

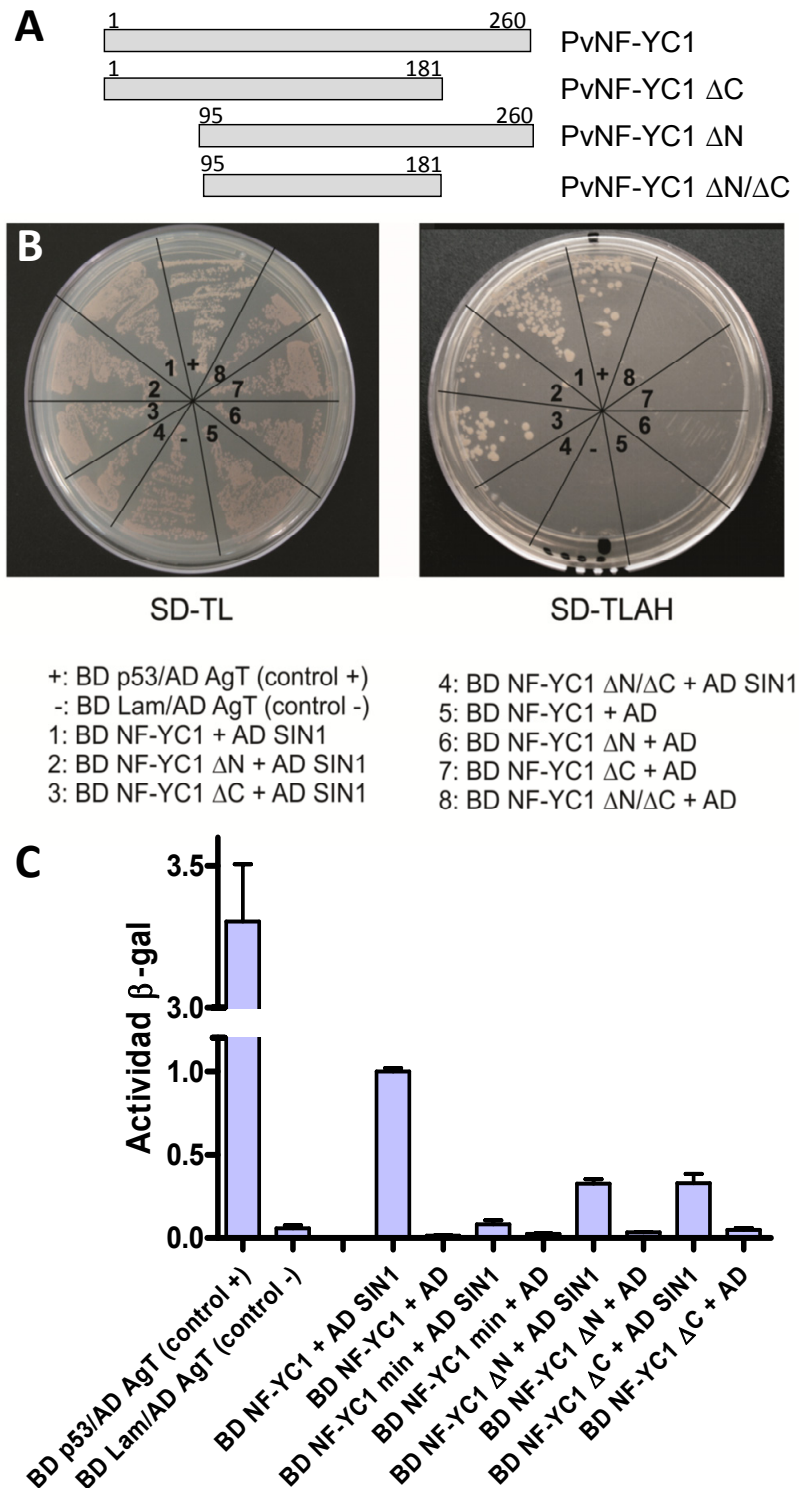


Figura 37. Interacción de PvNF-YC1 con SIN1 en ensayos de doble híbrido de levadura.

A. Representación esquemática de PvNF-YC1 y sus versiones truncadas diseñadas para ensayar la interacción.

B. Interacción en levadura usando el sistema de doble híbrido. El plásmido pGBKT7 que contiene el dominio de unión de Gal4 (BD) se fusionó a diferentes versiones de PvNF-YC1 y se introdujo en la cepa Y187 por transformación, mientras que pGADT7, que contiene el dominio de activación de Gal4 (AD), se fusionó a SIN1 y se introdujo en la cepa AH109. Estas cepas se aparearon en las combinaciones indicadas (1 a 8) y fueron seleccionadas en medios SD que carecen de los aminoácidos Leu y Trp (SD-TL) o Leu, Trp, Ade y His (SD-TLAH). Los controles positivos y negativos corresponden a la interacción entre p53 y las proteínas Antígeno-T y Lamina C, respectivamente.

C. Actividad β-galactosidasa medida en las levaduras diploides.

Para confirmar la interacción física entre las proteínas PvNF-YC1 y SIN1 en el contexto de una célula vegetal, se llevó a cabo un ensayo de BiFC (Figura 38). SIN1 y PvNF-YC1 se fusionaron a las regiones C y N terminal de la proteína fluorescente YFP y se expresaron en pares complementarios en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. Al cabo de 48 horas luego de la agroinfiltración se detectó una señal fluorescente que corresponde a la longitud de onda de emisión de YFP, predominantemente en el núcleo de las células epidérmicas (Figura 38, segundo y tercer panel). Esta señal no se detectó cuando se co-expresaron la región C-terminal de la YFP sola (sin fusionar a alguna proteína) y PvNF-YC1 fusionada a la región N terminal de la YFP o bien la región N terminal de la YFP sola y SIN1-CYFP (controles negativos, Figura 38, paneles inferiores). También se visualizó una señal de fluorescencia intensa en el núcleo cuando se utilizaron las proteínas NSP1 y NSP2 de *M. truncatula* fusionadas a los dominios N- y C-terminal de la YFP, respectivamente, como control positivo de BiFC (Figura 38, panel superior) (Hirsch et al., 2009). En conclusión, nuestros resultados sugieren que SIN1 y PvNF-YC1 interactúan tanto en levaduras como en planta y que la interacción tiene lugar principalmente en los núcleos de las células vegetales.

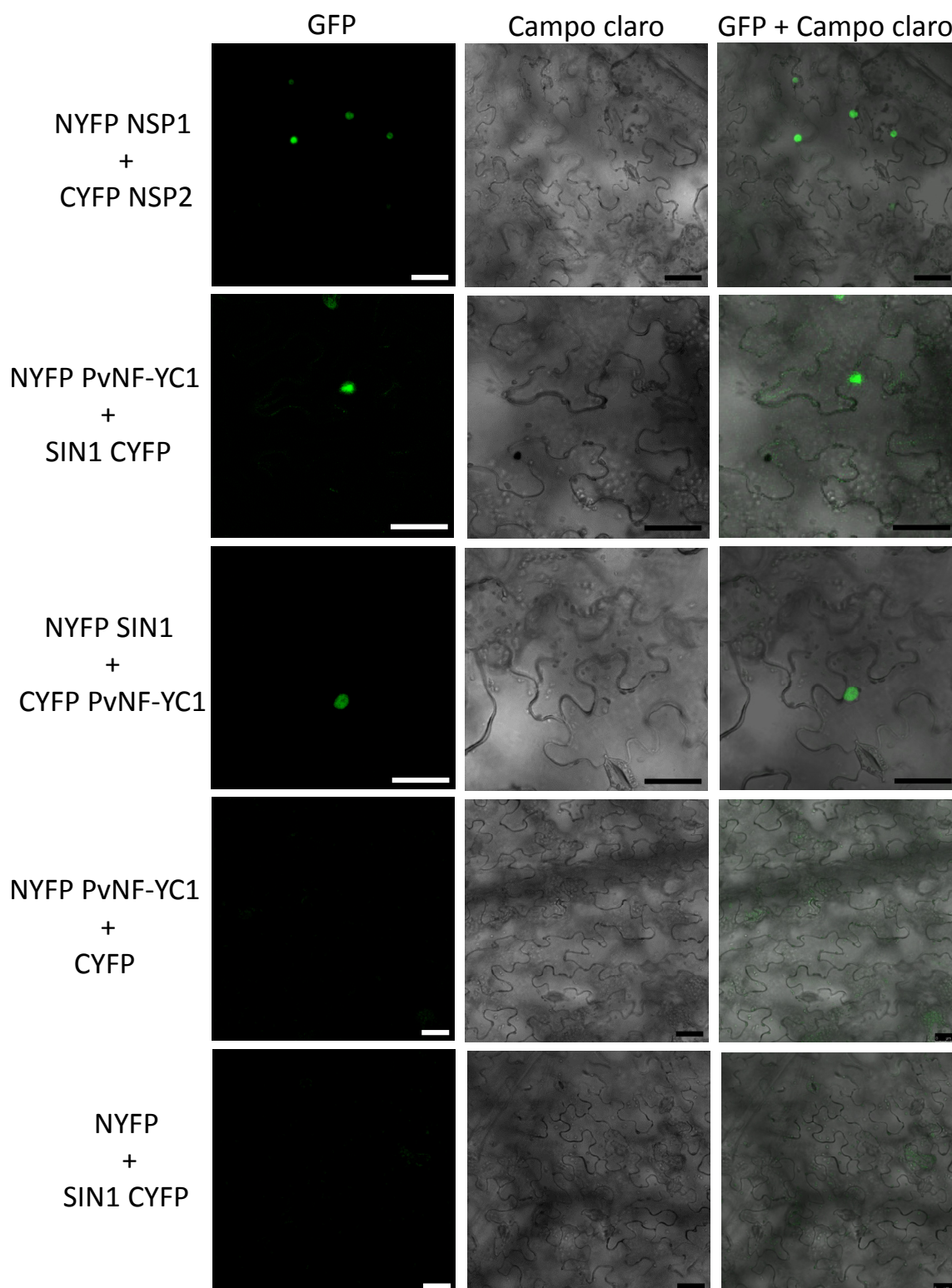


Figura 38. Interacción de PvNF-YC1 y SIN1 *in planta*. Ensayo de BiFC que muestra la interacción entre PvNF-YC1 y SIN1 en células epidérmicas de *N. benthamiana* (segundo y tercer panel). Las hojas fueron agroinfiltradas con *A. tumefaciens* portando las construcciones indicadas. La interacción entre NSP1 y NSP2 de *M. truncatula* se muestra como un control positivo (primer panel). Los paneles inferiores corresponden a los controles negativos (NYFP y CYFP corresponden a las regiones amino y carboxilo terminal de la YFP sin fusionar a alguna proteína de interés). La misma imagen se muestra bajo luz UV (izquierda), obtenida por microscopía confocal, luz blanca (en el centro) y su combinación (derecha). Barra = 25 μ m.

Como se mencionó en la introducción, NSP1 y NSP2 son proteínas de la familia GRAS capaces de formar homo y heterodímeros (Hirsch et al., 2009) por lo cual se decidió evaluar la interacción cruzada de estos dos factores de transcripción con SIN1 y PvNF-YC1. No se observó señal fluorescente cuando la interacción de PvNF-YC1 o SIN1 fue probado contra NSP1 o NSP2, por lo que estos resultados sugerirían una especificidad de interacción entre PvNF-YC1 y SIN1 (Figura 39).

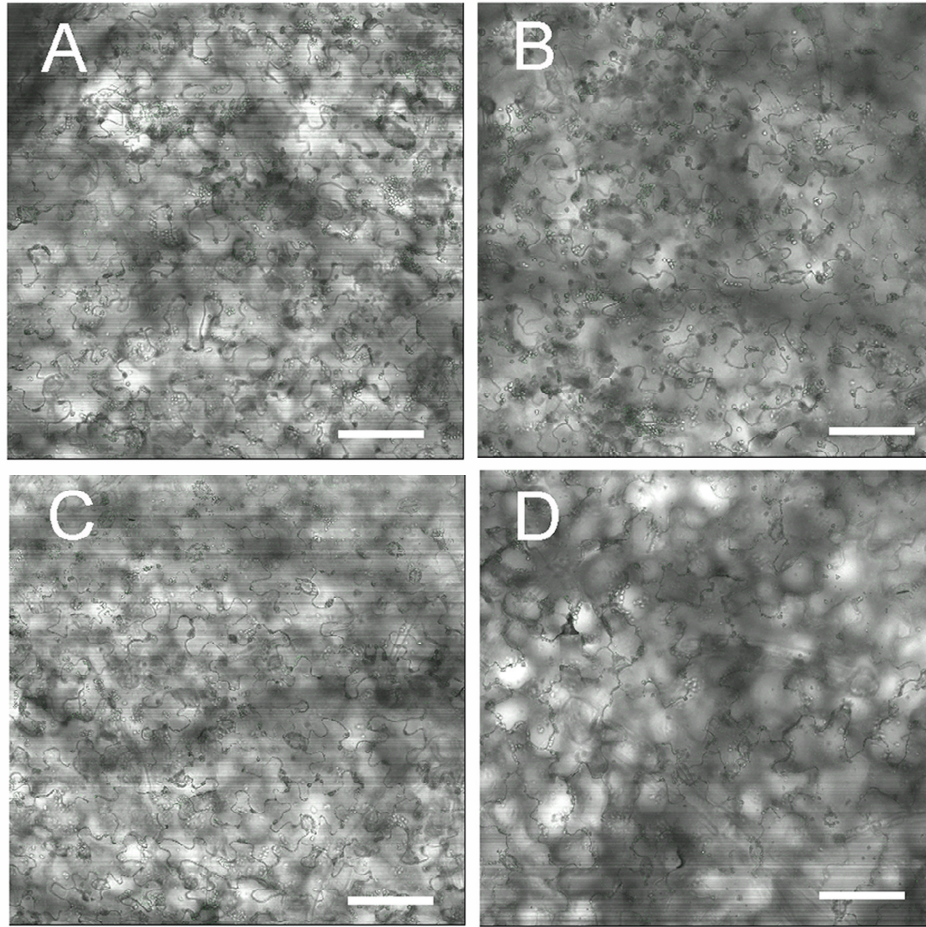


Figura 39. Interacción negativa de PvNF-YC1 y SIN1 con NSP1 y NSP2. Ensayos de BiFC en células epidérmicas de *N. benthamiana* que muestran la fluorescencia de YFP se fusionaron con imágenes visibles. Las células fueron agroinfiltradas con CYFP-PvNF-YC1 y NYFP-NSP1 (**A**), NYFP-PvNF-YC1 y CYFP-NSP2 (**B**), SIN1-CYFP y NYFP-NSP1 (**C**), NYFP-SIN1 y CYFP-NSP2 (**D**). Las barras corresponden a 50 μ m (A, B y C) y 25 μ m (D).

2. Localización subcelular de SIN1

En función de los resultados de BiFC que muestran que la interacción de SIN1 y PvNF-YC1 ocurre principalmente en el núcleo de células vegetales, se analizó la presencia de secuencias de localización nuclear (NLS) en SIN1 utilizando el algoritmo optimizado para proteínas de plantas del programa PSORTII (Horton and Nakai, 1997). Se detectó una NLS conocida como pat7 a partir del aminoácido 452 (PRDDKKR) de la secuencia de SIN1. El dominio pat7 comienza con una P seguida por 3 residuos y luego un segmento básico que contiene 3 residuos K/R. A partir de la presencia de este NLS putativo se predijo una localización nuclear con un 70,6% de fiabilidad en base al método de Reinhardt para la discriminación citoplásmica/nuclear (Reinhardt and Hubbard, 1998). Con el fin de determinar la localización subcelular de SIN1, se expresó una fusión traduccional entre la GFP y SIN1 en hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas. La señal de fluorescencia correspondiente a la longitud de onda de emisión de la GFP fue visualizada tanto en el núcleo como en citoplasma de las células epidérmicas (Figura 40A). Para verificar que no ocurre clivaje de la fusión traduccional GFP-SIN1 se realizó un ensayo de WB con un anticuerpo anti-GFP. Se detectó una banda correspondiente al tamaño esperado para la fusión GFP-SIN1, verificando la integridad y la estabilidad de la proteína en hojas de *N. benthamiana* (Figura 40B). El conjunto de estos resultados indican que SIN1 se distribuiría entre el núcleo y el citoplasma, una distribución similar a la observada previamente para PvNF-YC1 (Zanetti et al., 2010).

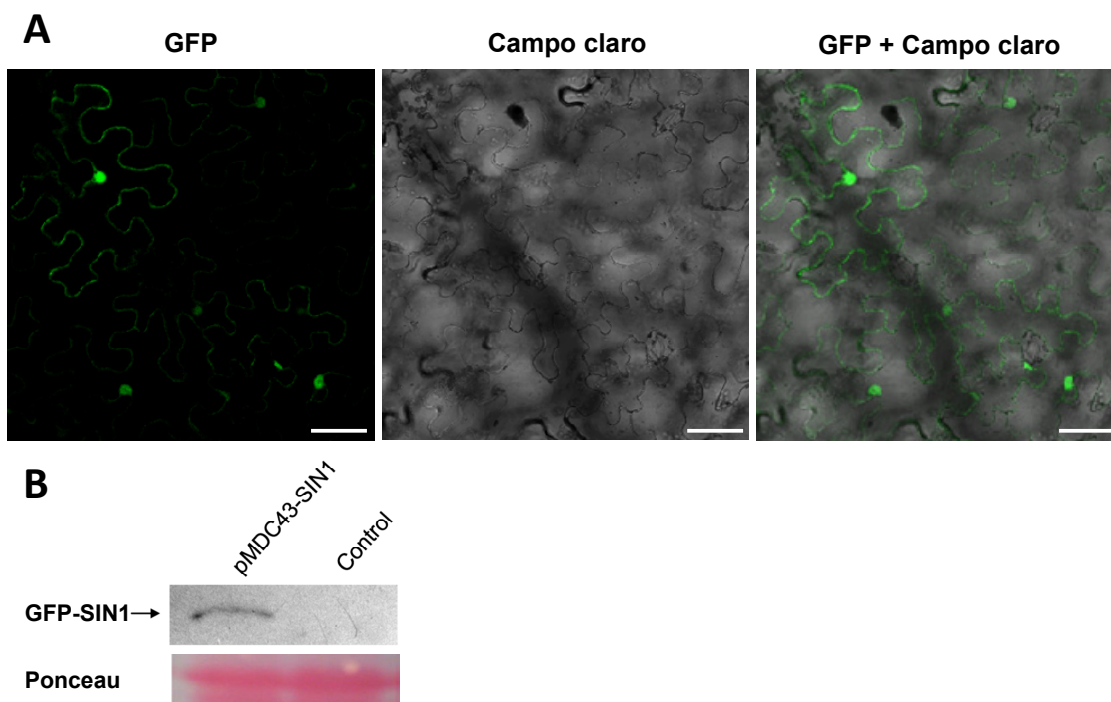


Figura 40. Localización subcelular de SIN1.

A. El ORF de SIN1 se clonó en el plásmido pMDC43 para obtener la fusión GFP-SIN1. Esta construcción fue introducida en células de las hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración. La misma imagen, obtenida por microscopía confocal, se muestra en el canal de la GFP (izquierda), luz blanca (en el centro) y la combinación de ambas imágenes (derecha). Barra = 25 μ m.

B. Se extrajeron las proteínas de las hojas agroinfiltradas con GFP-SIN1 o con una cepa no transformada de *A. tumefaciens* (control), se sometieron a SDS-PAGE, y se analizó por inmunoblot con anticuerpos anti-GFP, revelando la presencia de una única banda con el tamaño esperado de 88 kD (izquierda).

3. Perfil de expresión de *SIN1* en diferentes órganos de *P. vulgaris* y a tiempos tempranos de la interacción con *R. etli*

Con el fin de analizar el perfil de expresión de *SIN1* en poroto se determinaron los niveles de transcritos en diferentes órganos de esta planta mediante RT-qPCR. Se detectaron niveles de expresión de *SIN1* en órganos fotosintéticos y no fotosintéticos; sin embargo, los niveles de transcritos de *SIN1* fueron mayores en raíces que en hojas o tallos de plantas de 7 días. A su vez, los niveles acumulados de mRNA fueron mayores en nódulos de 14 dpi en comparación con nódulos más jóvenes, es decir, de 7 dpi (Figura 41A). Puesto que en el laboratorio se había demostrado previamente un aumento de los niveles de mRNA de *PvNF-YC1* en raíces en estadios tempranos de la

inoculación con *R. etli* (Peltzer Meschini et al., 2008; Zanetti et al., 2010) se analizó la acumulación de transcritos de *SIN1* a 24 hpi y a 4 dpi. No se observaron diferencias entre las raíces inoculadas y no inoculadas (Figura 41B), al menos a los tiempos analizados; sin embargo, no es posible descartar que existan diferencias en otros estadios de la interacción. Por otra parte, la expresión del gen homólogo filogenéticamente más cercano a *SIN1*, Phvul.006G141700, reveló un patrón de expresión completamente distinto: observamos una mayor acumulación de transcritos de este gen en hojas en comparación con el resto de los órganos evaluados, tales como tallo, raíz y nódulos (Figura 41C).

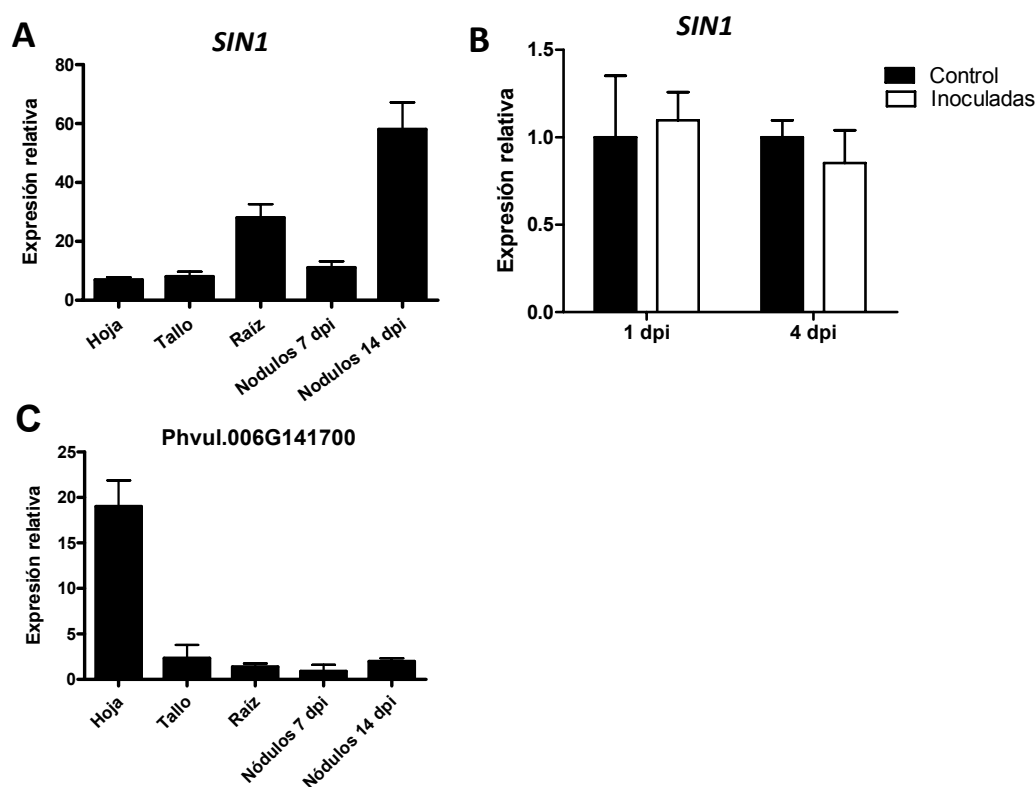


Figura 41. Expresión relativa de *SIN1* y de su mejor homólogo en diferentes órganos.

A. Análisis de acumulación de transcritos de *SIN1* por RT-qPCR en diferentes órganos de poroto. El RNA total fue extraído de los diferentes órganos (hoja, tallo, raíz, nódulos de 7 y 14 dpi con *R. etli*). La expresión en raíces y nódulos de 14 dpi fue significativamente superior respecto al resto de los tejidos en un t-test de Student con $P < 0.05$.

B. Niveles de mRNA de *SIN1* en raíces luego de la inoculación con la cepa de *R. etli* SC15 o con el medio de crecimiento para rizobios YEM (Control) a las 24 horas (1 dpi) o 4 dpi. Los valores se presentan relativos al valor del control a 1 dpi. No se observaron diferencias significativas entre los valores del control y las raíces inoculadas a ninguno de los tiempos evaluados.

La expresión de *SIN1* se normalizó con los valores de expresión del gen *EF1α*. Los datos representan la media de tres réplicas técnicas y son representativos de dos experimentos independientes. Las barras de errores representan el SD.

C. Niveles de Phvul.006G141700 determinados por RT-qPCR en diferentes órganos de *P. vulgaris*. La expresión del gen Phvul.006G141700 fue normalizada con valores de expresión de *EF1α* y presentada en relación al valor obtenido en raíz. Los datos son la media de tres repeticiones técnicas. Las barras de error representan la SEM.

Considerando la similitud de secuencia amino acídica entre SIN1 y su ortólogo putativo en *M. truncatula* (ver Figura 9B), se propuso analizar el patrón de expresión de este gen mediante un análisis *in silico*. Los datos de expresión del ortólogo putativo/mejor homólogo en *M. truncatula* (Medtr4g133660) se obtuvieron a partir de los datos de RT-qPCR reportados por Moreau et al (2011) y de datos de secuenciación masiva reportados por Roux et al (2014). Los transcritos de este gen exhiben un patrón de expresión similar al de *SIN1* en *P. vulgaris*, con una mayor expresión en nódulos maduros de 14 y 16 dpi (Figura 42A). Dentro de las diferentes zonas en las que se dividen los nódulos indeterminados (Figura 42B), Medtr4g133660 presentó mayores niveles de expresión en la zona meristemática (FI), aunque también se expresa en menores niveles en el resto de las zonas (Figura 42C). El patrón de expresión observado para *SIN1* en ambas plantas leguminosas es compatible con una función en las etapas tardías de la interacción simbiótica entre leguminosas y rizobios.

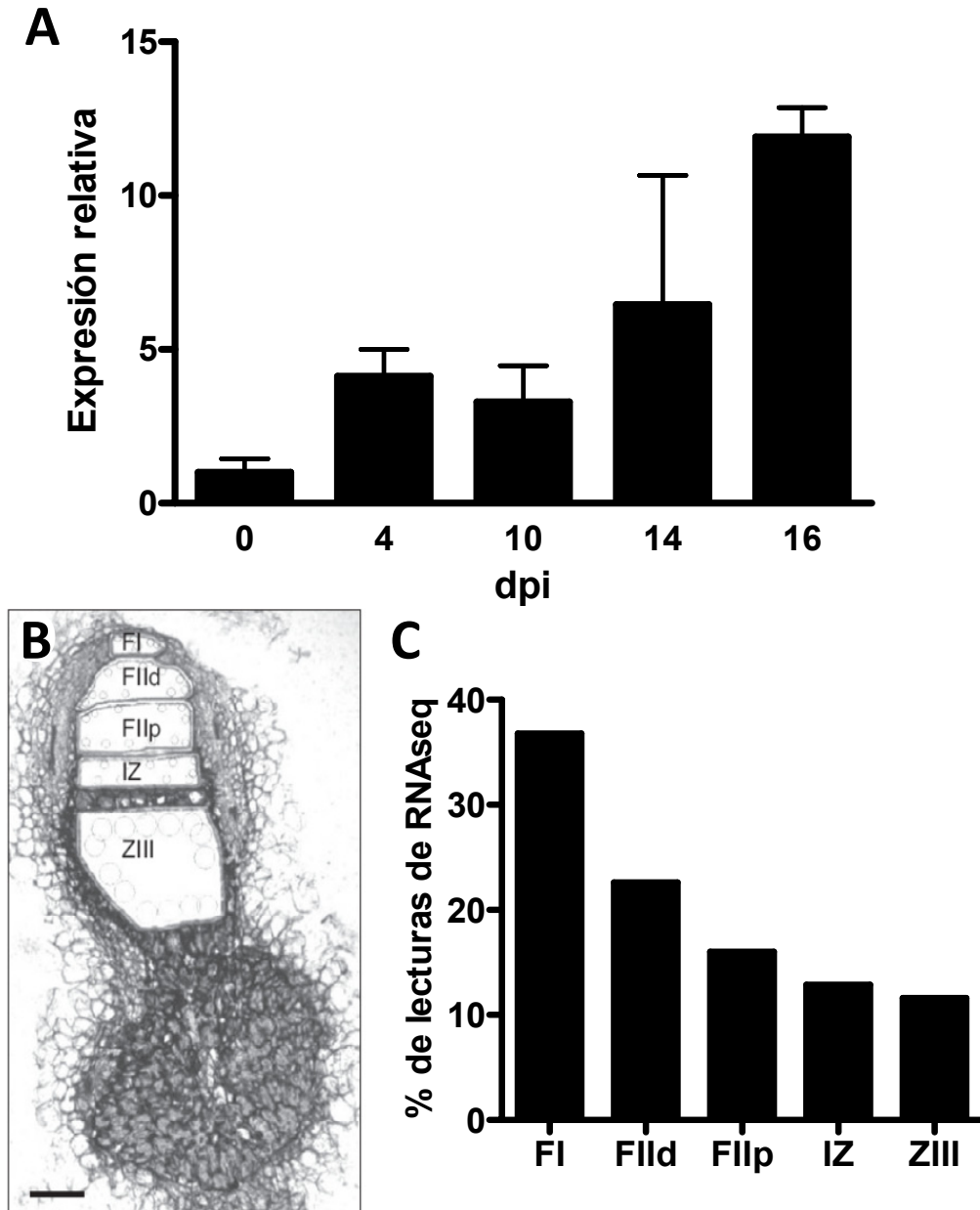


Figura 42. Expresión del mejor homólogo de SIN1 en *M. truncatula*.

A. Los niveles de expresión del gen Medtr4g133660 se obtuvieron a partir de los datos publicados por Moreau et al (2011) a partir de RNA total extraído de nódulos aislados (4, 10, 14 y 16 dpi) de *M. truncatula*. Los datos se presentan relativos a la expresión en la raíz a tiempo 0 (0). Los datos son la media de tres repeticiones técnicas. Las barras de error representan la SEM.

B. Microdissección laser de las 5 zonas de un nódulo indeterminado de *M. truncatula*. FI: zona meristemática. La zona de infección fue dividida en dos: distal (FIld) y proximal (FIlp). IZ: interzona de diferenciación a bacteroide. ZIII: zona de fijación de nitrógeno. Imágen tomada de Roux et al (2014). Barra: 100 μ m

C. Los niveles de expresión de Medtr4g133660 en diferentes secciones de nódulos fueron obtenidos a partir de los datos de secuenciación masiva de RNA publicados por Roux et al (2014) generados a partir de microdissección de nódulos de 15 dpi con *S. meliloti*.

4. Generación de plantas compuestas con niveles reducidos en *SIN1*

Para estudiar la función de *SIN1* en la raíz se generaron plantas de *P. vulgaris* con niveles reducidos en *SIN1*. La expresión de un RNAi que corresponde a una región de 400 pb del extremo 5' del transcripto de *SIN1* (*SIN1* RNAi) produjo una reducción de un 80-90 % de los niveles de mRNA de *SIN1*, en comparación con las raíces control que expresan la construcción *GUS* RNAi (Figura 43). Para evaluar la especificidad del PTGS generado por la estrategia de RNAi, se diseñaron *primers* específicos para *SIN1* y para otros miembros de la subfamilia PAT1 de poroto. El homólogo más cercano de *SIN1*, Phvul.006G141700, mostró una reducción del 46 % en comparación con las raíces control. Esto indica que la construcción diseñada para disminuir los niveles de transcriptos de *SIN1* afectó parcialmente los niveles de transcriptos del gen Phvul.006G141700 (Figura 43). Los niveles de transcriptos de los otros dos miembros de la familia PAT1, los mejores homólogos de PAT1 y SCL8 de Arabidopsis en *P. vulgaris* (Phvul.008G286000 y Phvul.007.G073500, respectivamente) no fueron modificados por la expresión de la construcción *SIN1* RNAi (Figura 43). Teniendo en cuenta que los factores de transcripción NSP1 y NSP2 son esenciales para la formación de nódulos en *M. truncatula* (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005), también se cuantificaron los niveles de mRNA de los supuestos ortólogos/ mejores homólogos de estos genes en *P. vulgaris*, Phvul.010G129400 y Phvu1.009G122700, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en los niveles de transcriptos de estos genes entre raíces *GUS* y *SIN1* RNAi, indicando que el/los pequeño/s RNA/s generado/s por la expresión de la construcción *SIN1* RNAi no estaría/n afectando los transcriptos correspondientes a NSP1 o NSP2 de poroto (Figura 43). Nuestros resultados indican que la construcción *SIN1* RNAi produce un silenciamiento fuerte de *SIN1* y en menor medida de Phvul.006G141700, un gen que exhibe 74 % de identidad

con *SIN1* a nivel de aminoácidos, pero un patrón de expresión muy distinto (ver Figura 41C).

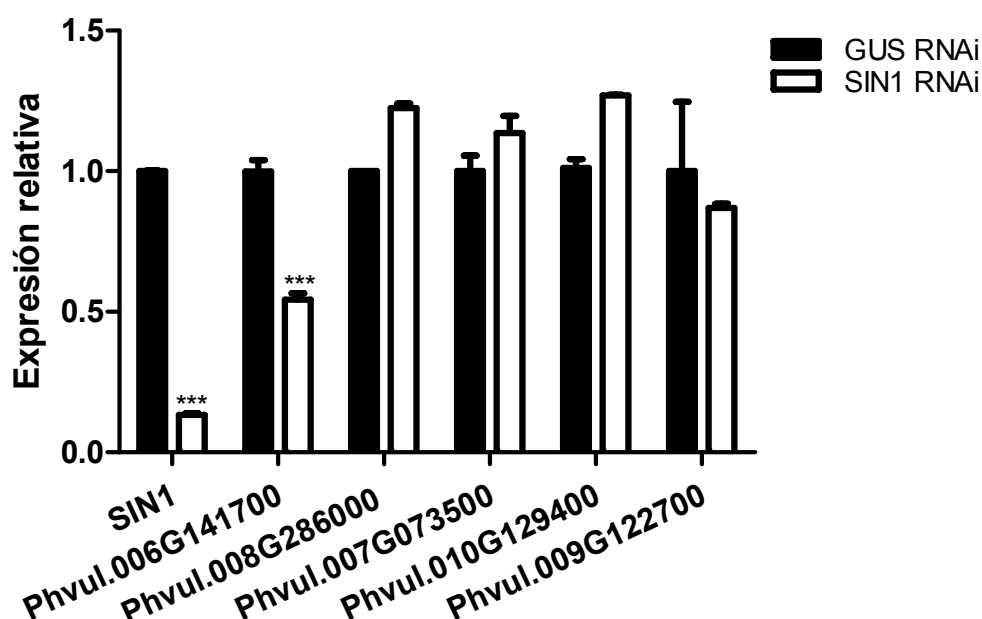


Figura 43. Silenciamiento génico post-transcripcional de *SIN1*. Los niveles de transcritos de *SIN1* y de otros miembros de la familia GRAS fue determinada por RT-qPCR en raíces control (*GUS* RNAi) y *SIN1* RNAi. La expresión de cada gen se normalizó con los valores de *EF1α* y se presentan en relación a las raíces control. Los resultados son la media de tres repeticiones técnicas y representativos de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el SD. Los asteriscos indican diferencias significativas en un t-test $p < 0,001$ comparando los valores de *GUS* RNAi y *SIN1* RNAi para cada gen.

5. Efecto del silenciamiento de *SIN1* en la arquitectura de la raíz

La arquitectura del sistema radical es una consecuencia de la actividad sostenida de los meristemas apicales de la raíz, que conducen al crecimiento indeterminado de este órgano, así como la formación *de novo* de órganos laterales como los nódulos y las raíces laterales (Gonzalez-Rizzo et al., 2009; Oldroyd et al., 2011). La iniciación, emergencia y el crecimiento de las raíces laterales dependen de la disponibilidad de agua y nutrientes. Estos procesos son regulados por una combinación de vías locales y sistémicas. Varios miembros de la familia GRAS han sido vinculados a diferentes procesos de desarrollo de raíz, incluyendo el desarrollo de patrones radiales, crecimiento de la raíz principal y elongación celular (Bolle, 2004). En función de estos

antecedentes se comparó la arquitectura de las raíces de las plantas *SIN1* RNAi con aquellas de plantas control que expresan *GUS* RNAi. No se observaron diferencias evidentes en la organización celular de la zona apical de la raíz entre plantas *GUS* y *SIN1* RNAi (Figura 44A). También se evaluó la longitud de la raíz primaria que surge a partir del callo (raíz principal), así como las raíces laterales primarias y secundarias (LR1 y LR2, respectivamente; ver Figura 27A). La longitud de la raíz principal no se vio significativamente afectada por la expresión de la construcción *SIN1* RNAi (Figura 44B). Sin embargo, la longitud de las raíces laterales se redujo significativamente en las raíces *SIN1* RNAi en comparación con las raíces *GUS* RNAi (Figura 44C); las raíces laterales que emergen de las raíces principales (LR1) o desde el segundo punto de ramificación (LR2) presentaron una reducción de un 46 % y 80 % en su longitud frente a las raíces del control, respectivamente. Por otro lado, la densidad de las raíces laterales y la longitud de los pelos radicales en presencia o ausencia del microsimbionte SC15 no se vieron afectadas por el silenciamiento de *SIN1* (Figuras 44D y E). Este resultado sugiere que este factor de transcripción de tipo GRAS, perteneciente a la subfamilia PAT1, podría estar implicado específicamente en la etapa de elongación post-emergencia de las raíces laterales.

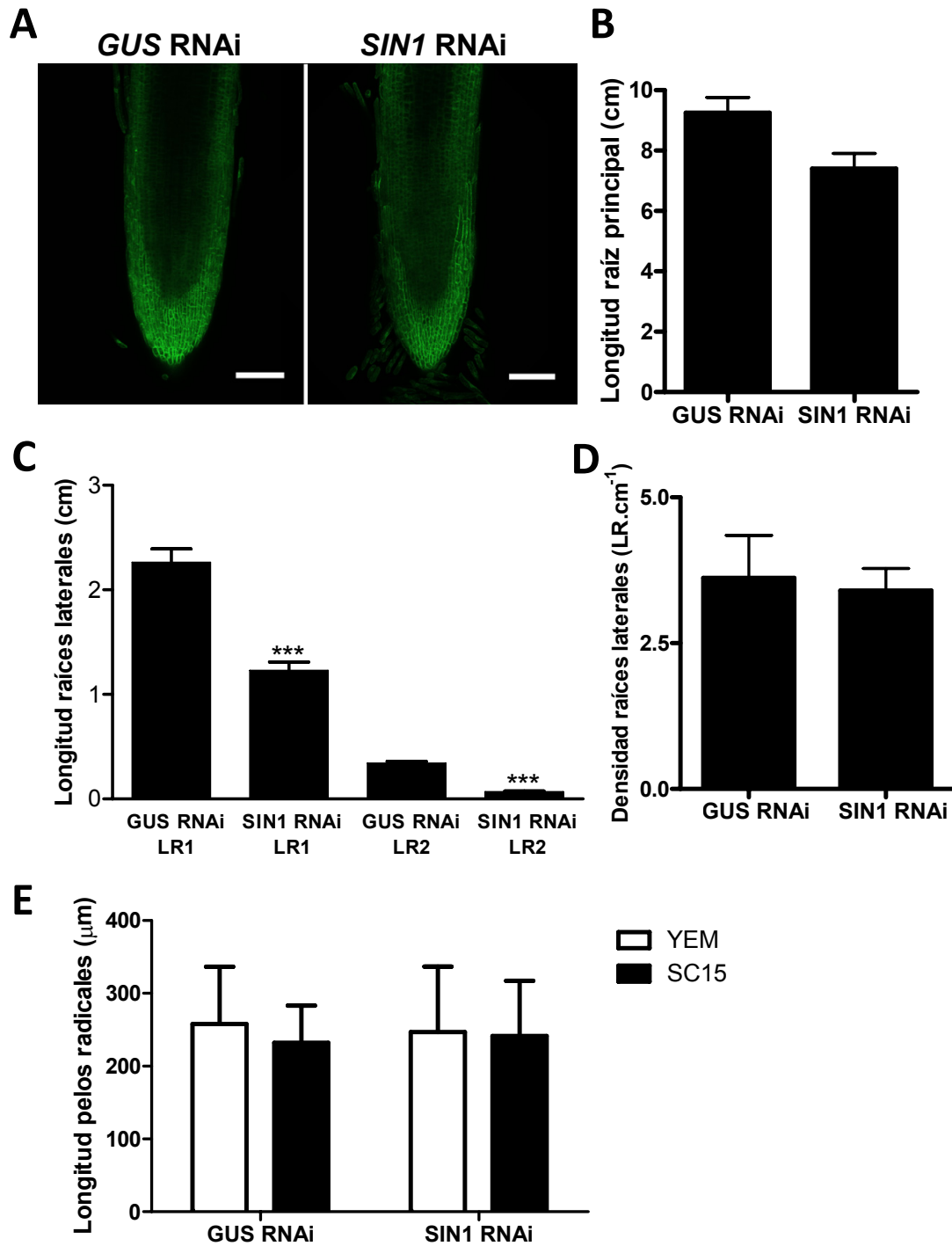


Figura 44. Efecto del silenciamiento de *SIN1* sobre el desarrollo de raíces.

A. Organización general de las células de la punta de la raíz de plantas *GUS* (izquierda) o *SIN1* RNAi (derecha). Las raíces fueron observadas en un microscopio confocal de fluorescencia con ajustes óptimos para GFP. Las imágenes fueron obtenidas por la integración en z de secciones de 5 μm. Bar = 100 μm.

B, C, D. La longitud de la raíz principal (B), LR1 y LR2 (C) y la densidad de LR1 (D) fue medida en raíces *GUS* y *SIN1* RNAi. Los asteriscos en C indican diferencias significativas en un t-test de *Student* con $P < 0.0001$ ($n > 100$). No se observaron diferencias significativas en C y E entre los valores de *GUS* y *SIN1* RNAi ($n > 100$). Las barras de error representan el SD de dos replicas biológicas.

E. Se determinó la longitud los pelos radicales en raíces inoculadas con *R. etli* SC15 o medio YEM (control). No se observaron diferencias significativas entre los valores de *GUS* y *SIN1* RNAi ($n > 100$). Las barras de error representan el SD de dos replicas biológicas.

6. Evaluación del efecto del silenciamiento de *SIN1* en los eventos tempranos de la nodulación y la formación de nódulos

SIN1 se identificó como una proteína que interacciona con PvNF-YC1, un regulador transcripcional necesario para la organogénesis y el desarrollo de los nódulos, por lo que se evaluó el efecto del PTGS de *SIN1* sobre la formación de nódulos. La expresión de *SIN1* RNAi en raíces de *P. vulgaris* produjo una marcada reducción (~75-80 %) en el número de nódulos formados tras la inoculación con *R. etli* SC15 (Figura 45A). Esta reducción se observó a los 7 dpi y persistió hasta los 18 dpi, el último tiempo analizado en estos experimentos (Figura 45B). Además, los pocos nódulos formados en las raíces *SIN1* RNAi fueron significativamente más pequeños que aquellos desarrollados en las raíces GUS RNAi (Figuras 45A y C). Sin embargo, el crecimiento de los nódulos se vio retrasado, pero no detenido en raíces *SIN1* RNAi, ya que el diámetro de los nódulos continuó aumentando a lo largo del tiempo (de 6 a 19 dpi; Figura 45C). A los 7 dpi, la mayoría de los nódulos formados en las raíces *SIN1* RNAi se encontraban infectados por bacterias, pero la ocupación de estos nódulos por una cepa de *R. etli* que expresa la proteína fluorescente DsRed se vio reducida en comparación con los nódulos formados en las plantas control (Figuras 45D). Micrografías de secciones de nódulos maduros teñidas con azul de toluidina revelaron que el tejido central de los nódulos *SIN1* RNAi contenía tanto células infectadas como no infectadas, pero el área colonizada era menor en comparación con nódulos GUS RNAi (Figura 45E y F).

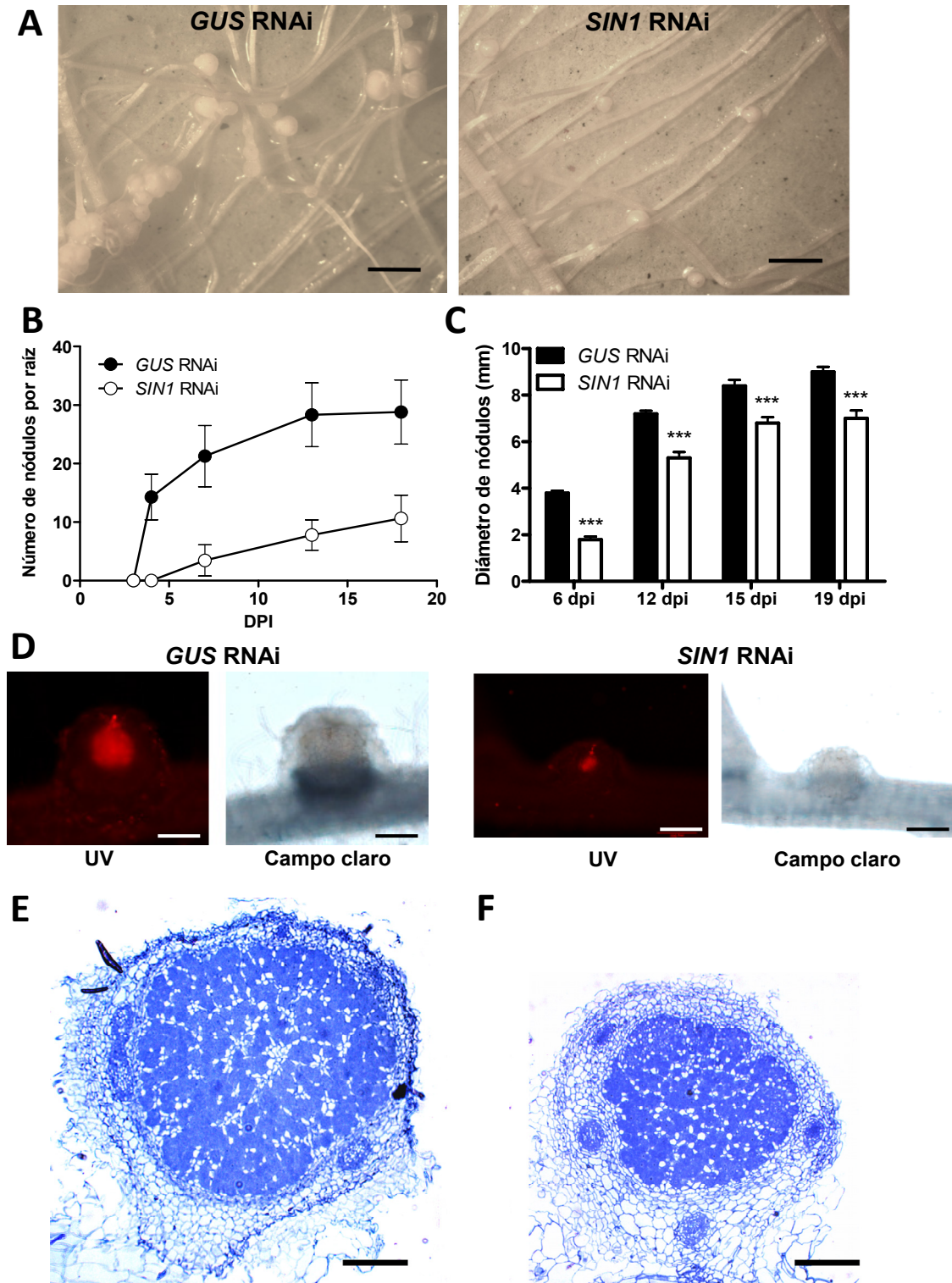


Figura 45. Fenotipo de nodulación de las plantas *SIN1* RNAi.

A. Fotos ilustrando el fenotipo de nodulación de raíces de 7 dpi con *R. etli* SC15 de plantas *GUS* (panel izquierdo) y *SIN1* RNAi (panel derecho).

B y C. El número (B) y el tamaño (C) de los nódulos se registraron en ambos tipos de plantas a diferentes tiempos luego de la inoculación con *R. etli* SC15. Los asteriscos en C indican diferencias significativas en un t-test con $P < 0,001$ ($n > 120$).

D. La ocupación de los nódulos se examinó a los 5 dpi con una cepa de *R. etli* que expresa la proteína DsRed por microscopía de epifluorescencia en raíces *GUS* (paneles izquierdos) y *SIN1* RNAi (paneles derechos) bajo UV o luz visible.

E y F. Secciones longitudinales de nódulos formados en raíces *GUS* (E) o *SIN1* RNAi (F) a los 21 dpi con *R. etli* cepa SC15. Barras = 1 cm (A), 500 μ m (D) y 300 μ m (E y F).

El fenotipo producido por la expresión de *SIN1* RNAi sugiere que este gen podría estar implicado en la organogénesis y crecimiento de los nódulos, pero también se consideró la posibilidad de que *SIN1* cumpliera una función en el proceso de infección rizobiana. Por lo tanto, se cuantificó el número y la progresión de los eventos de infección en raíces *GUS* y *SIN1* RNAi inoculadas con una cepa de *R. etli* que expresa la proteína DsRed. El número de ITs por centímetro de raíz se redujo ligeramente en las raíces *SIN1* RNAi a los 4 y 8 dpi; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 46A). Para estudiar el efecto del silenciamiento de *SIN1* sobre la progresión de la infección, los ITs fueron clasificados de acuerdo a su avance hasta las células en división del córtex, aquellos que abortan en las células epidérmicas y los que abortan en el pelo radical (ver Figura 34C). Mientras que en las plantas control se encontró que la mayoría de los ITs alcanzaban las células del córtex, en las plantas *SIN1* RNAi se observó un mayor porcentaje de eventos de infección que abortaron en el pelo radical tanto a los 4 como a los 8 dpi (Figura 46B). En conjunto, nuestros resultados sugieren que *SIN1* no es requerido para la iniciación del IT, pero tiene una función clave en su progresión.

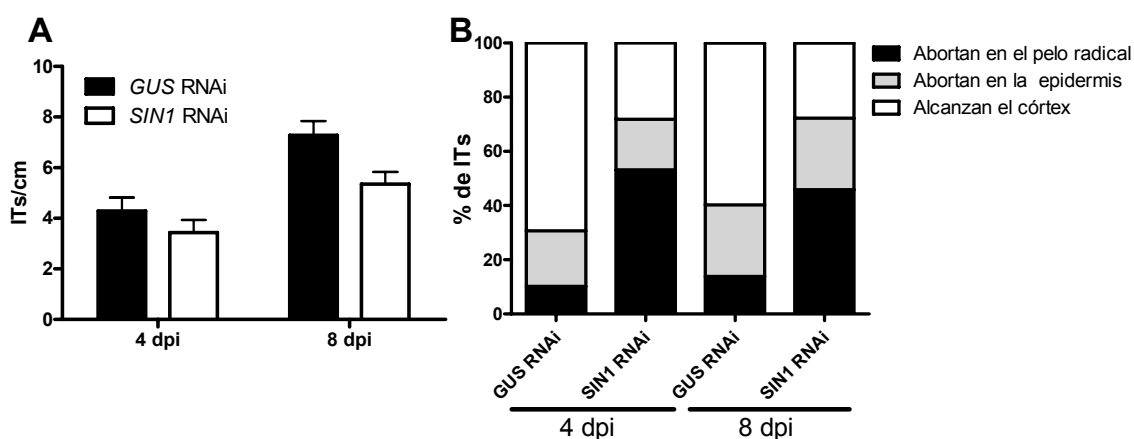


Figura 46. Efecto del silenciamiento de *SIN1* sobre los eventos de infección rizobiana.

A. La densidad de ITs (número de IT por centímetro de raíz) formados en las plantas compuestas *GUS* y *SIN1* RNAi se cuantificó a los 4 y 8 dpi con una cepa *R. etli* que expresa la proteína DsRed. No hubo diferencias significativas entre los valores de *GUS* y *SIN1* RNAi a 4 u 8 dpi en un t-test con $P < 0,05$ ($n > 60$). **B.** Los ITs formados fueron clasificados como eventos que alcanzan el córtex (barras blancas), la epidermis (barras grises), o que abortan en el pelo radical (barras negras) y expresado como porcentaje del total. El número de ITs que terminan en pelo o que alcanzan el córtex fueron significativamente mayores en las plantas *SIN1* RNAi que en las *GUS* RNAi en un t-test con $P < 0,05$, mientras que los eventos que abortan en la epidermis no mostraron variaciones significativas ($n > 60$).

7. Efecto del silenciamiento de SIN1 sobre la expresión de nodulinas tempranas y genes del ciclo celular

Con el fin de estudiar si SIN1 es requerido para la activación de respuestas moleculares tempranas de leguminosas frente a la infección por los rizobios, analizamos la expresión de genes que son inducidos en las primeras etapas de la interacción en plantas control y *SIN1* RNAi. Para este análisis se seleccionaron *RIP1*, *ERN1* y *ENOD40*, un grupo de genes que, como se mencionó previamente, incrementan sus niveles de mRNA en *P. vulgaris* frente la inoculación con rizobios (Blanco et al., 2009; Zanetti et al., 2010). Los tres genes seleccionados mostraron un aumento de los niveles de mRNA en respuesta a la inoculación con *R. etli* a las 24 hpi en plantas *GUS* RNAi, confirmando los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Figura 47). La expresión de *SIN1* RNAi no afectó significativamente la expresión de estos genes en las raíces control o inoculadas, en comparación con las plantas *GUS* RNAi. Teniendo en cuenta la interacción física entre las proteínas SIN1 y PvNF-YC1, nos preguntamos si el silenciamiento de *SIN1* podría tener algún efecto en los niveles de transcripción de dos subunidades del complejo heterotrimérico NF-Y, PvNF-YC1 y PvNF-YA1. Como se muestra en la Figura 47A, los transcritos de ambos genes aumentaron en respuesta a los rizobios y no se observaron diferencias significativas entre plantas *GUS* y *SIN1* RNAi en el caso de *PvNF-YC1*. Sin embargo, la acumulación de mRNAs de *PvNF-YA1* en respuesta a la inoculación con rizobios fue afectada en las raíces *SIN1* RNAi en comparación con las *GUS* RNAi, lo que sugiere que SIN1 podría estar directa o indirectamente implicado en la respuesta transcripcional o post-transcripcional de *PvNF-YA1* a la infección rizobiana.

Debido a que PvNF-YC1 controla la expresión de genes implicados en la transición G2/M del ciclo celular que se activan durante la organogénesis nódulo (Zanetti et al., 2010), se decidió examinar si el silenciamiento de *SIN1* afectaba la expresión de dos de

estos genes: *CDC2* y *ciclina B*. Como se observa en la Figura 47B, el silenciamiento de *SIN1* también produjo una reducción de los niveles de transcritos *CDC2* y *CycB* en las raíces inoculadas en comparación con las controles, lo que sugiere que *SIN1* y *PvNF-YC1* podrían actuar de forma conjunta para desencadenar las respuestas moleculares que conducen a la activación de las divisiones corticales durante la formación de nódulos.

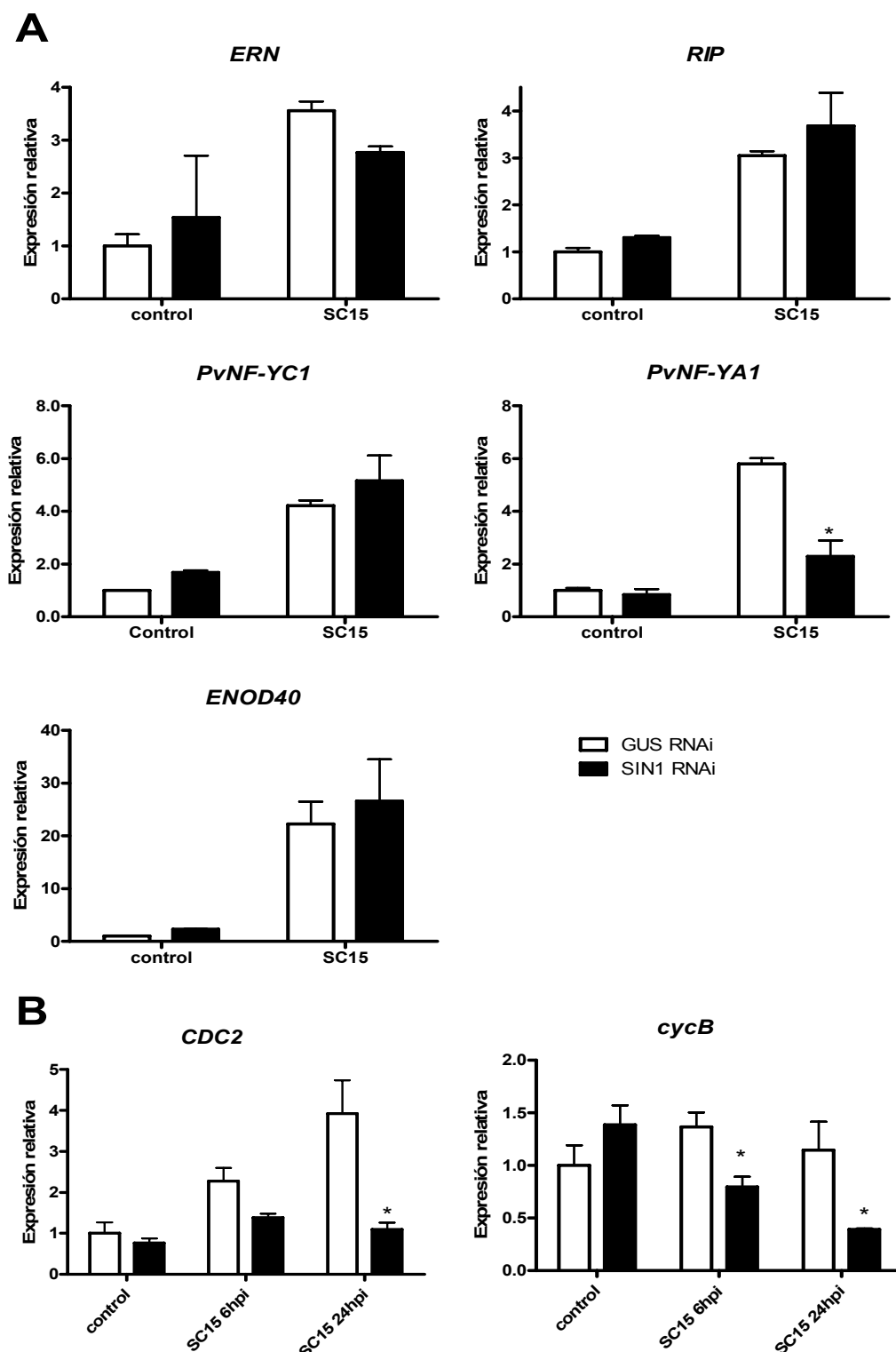


Figura 47. Efecto del silenciamiento de *SIN1* sobre la expresión de nodulinas tempranas (A) y genes del ciclo celular (B). Raíces que expresan *GUS* (barras blancas) o *SIN1* RNAi (barras negras) fueron inoculados con la cepa *R. etli* SC15. El tejido fue colectado a las 6 ó 24 hpi. Los controles fueron tratados con medio de crecimiento para rizobios (YEM) durante 24 h. La expresión de los genes indicados se determinó mediante RT-qPCR. Los valores fueron normalizados con los valores de expresión de *EF1 α* , y presentados en relación a los valores de las raíces control de *GUS* RNAi. Los datos son la media de tres repeticiones técnicas, y otros dos experimentos independientes mostraron los mismos resultados. Las barras de error representan el SD. Los asteriscos indican que los valores de expresión en *SIN1* RNAi son significativamente diferentes de los de raíces *GUS* RNAi al mismo tiempo de inoculación, en un t-test con $P < 0.01$.

Capítulo III - Discusión

SIN1 es requerido para el desarrollo de las raíces laterales

En este tercer capítulo de la tesis hemos caracterizado una proteína perteneciente a la familia GRAS, específica de plantas, a la cual denominamos SIN1, capaz de interactuar físicamente con PvNF-YC1. Ambas proteínas son necesarias para la organogénesis del nódulo durante la interacción simbiótica entre poroto y rizobios. Como se mencionó anteriormente, las proteínas GRAS están involucradas en diferentes procesos de desarrollo. Algunos miembros de la familia son requeridos para la determinación de la identidad de las capas celulares de la raíz (familias SHR y SCR), el desarrollo de meristemas axilares (*Lateral Supresor*), el mantenimiento del meristema apical (HAM), la respuesta al ácido giberélico y jasmónico (DELLA), y la señalización en respuesta a la luz (PAT1) (Sun et al., 2012). Además, tres miembros de la familia GRAS se identificaron previamente como requeridos para las interacciones simbióticas en *M. truncatula*: NSP1, NSP2 y RAM1 (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005; Gobbato et al., 2012). El heterodímero formado por NSP1 y NSP2 se asocia a los promotores de genes inducibles por NF, que conducen a respuestas moleculares específicas para la interacción leguminosas-rizobios, mientras que la dimerización de NSP2 con RAM1 activa un programa molecular que conduce a la micorrización arbuscular (Hirsch et al., 2009; Gobbato et al., 2012). Por otra parte, SHR y SCR, otros miembros de la familia de genes GRAS, también pueden formar un heterodímero que define la formación de una sola capa celular endodérmica en plantas (Cui et al., 2007). SIN1, al igual que NSP1 y NSP2, está involucrado en la nodulación, pero también en el crecimiento de las raíces laterales, un proceso de desarrollo que aún no ha sido vinculado a otros miembros de los reguladores transcripcionales GRAS.

SIN1 forma un complejo estable con PvNF-YC1 *in planta*

Nuestros resultados mostraron que SIN1 se localiza principalmente en el núcleo, pero también en el citoplasma de hojas de *N. benthamiana*. Se ha reportado que otras proteínas GRAS se localizan en el núcleo, en el citoplasma o distribuidos en diferentes compartimentos subcelulares (Bolle, 2004). Por ejemplo, las dos proteínas GRAS involucrados en la simbiosis leguminosas-rizobios presentan diferentes localizaciones dentro la célula: NSP1 se encuentra en el núcleo, mientras que NSP2 es visualizado en la membrana nuclear y el retículo endoplasmático, y es translocado al núcleo de células epidérmicas de la raíz luego de la percepción del NF (Kalo et al., 2005; Smit et al., 2005). Experimentos de BiFC indicaron que SIN1 y PvNF-YC1 son capaces de formar asociarse en el núcleo de las células de *N. benthamiana*, resultado esperable para dos reguladores transcripcionales que forman un complejo que modula la expresión génica. En función de los ensayos de doble híbrido de levadura, tanto el C y el N terminal de PvNF-YC1 parecen ser requeridos para una interacción eficiente con SIN1. En vista de que la localización de PvNF-YC1 es predominantemente nuclear (Zanetti et al., 2010), nuestros resultados sugieren que el complejo molecular entre ambas proteínas se forma directamente en el núcleo. Sin embargo, desconocemos si SIN1 se transloca rápidamente al núcleo como consecuencia de la interacción con PvNF-YC1, o bien en respuesta a la percepción del NF o de la infección rizobiana. Para evaluar esta última posibilidad debería analizarse la localización subcelular de la proteína SIN1 en raíces de *P. vulgaris* antes y después de la inoculación con rizobios o de la aplicación exógena de NF purificado.

SIN1 participa en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno entre *P. vulgaris* y *R. etli*

La simbiosis entre leguminosas y rizobios se basa en el desarrollo coordinado de dos procesos, la organogénesis del nódulo y la infección bacteriana (Oldroyd and Downie, 2008). Al igual que el silenciamiento de *PvNF-YC1* (Zanetti et al., 2010), la expresión de la construcción *SIN1* RNAi produjo una reducción en el número de nódulos desarrollados por raíz comparado con las plantas control *GUS* RNAi. Sin embargo, el fenotipo de la infección fue más severo en las plantas *PvNF-YC1* RNAi, mostrando una mayor proporción de eventos abortivos, una fuerte reducción de la densidad de ITs y una excesiva deformación de los pelos radicales, mientras que estos defectos no se observaron en raíces *SIN1* RNAi. Esta comparación sugiere que *PvNF-YC1* podría desempeñar una función en los primeros eventos que conducen a la formación del IT, independientemente de *SIN1*. Esta idea es consistente con el patrón de expresión de ambos genes, ya que los niveles de mRNAs de *PvNF-YC1* aumentaron tempranamente a las 3 hpi y se mantuvieron altos hasta las 24 hpi (Peltzer Meschini et al., 2008), mientras que los niveles de transcritos de *SIN1* no cambiaron durante las primeras etapas de la interacción. Comparando con el fenotipo observado en mutantes de *NSP1* y *NSP2*, nuestros resultados sugieren que *SIN1* actuaría en las etapas posteriores de la interacción. La expresión de *ERN* (un *target* directo del heterodímero *NSP1-NSP2*) y otras nodulinas tempranas no se vio afectada por el silenciamiento de *SIN1*. Por otro lado, *SIN1* y *PvNF-YC1* controlan, directa o indirectamente, la expresión de genes del ciclo celular, que son necesarios para desencadenar la división de las células corticales (Savouré et al., 1994; Yang et al., 1994). El hecho de que la expresión de *PvNF-YA1* se vea afectada por la caída de los niveles de *SIN1*, que *PvNF-YA1* controle los genes del ciclo celular (Capítulo II de esta tesis) y que *LjNF-YA1* es requerido para la división de

las células corticales (Soyano et al., 2013), apunta a una fuerte conexión entre SIN1 y los factores de transcripción NF-Y a distintos niveles.

SIN1 se expresa en mayores niveles en raíces que tejido aéreo, alcanzando sus máximos niveles de expresión en etapas tardías de la formación de nódulos. Sin embargo, los niveles de mRNA no cambiaron durante las etapas iniciales de la interacción con los rizobios. Este patrón de expresión es comparable al de *NSP1*, que se expresa constitutivamente en raíces y se mantiene inalterable tras la inoculación con rizobios, pero es diferente de *NSP2*, que se induce dos veces en raíces de *M. truncatula* a las 24 hpi con rizobios o después del tratamiento con NF de acuerdo con datos provenientes de microarreglos y RT-qPCR (Kalo et al., 2005). Por otro lado, *PvNF-YA1* y *PvNF-YC1* se inducen en estadios muy tempranos luego de la inoculación con rizobio (Figura 19), pero su expresión se mantiene a altos niveles en etapas más tardías de la interacción. El análisis fenotípico realizado sugiere que el complejo formado por SIN1 y PvNF-YC1 actuaría no sólo durante la división de las células corticales y el crecimiento del IT, sino también a tiempos posteriores, cuando los nódulos se están desarrollando y creciendo activamente.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones y perspectivas

En los últimos diez años, una cantidad creciente de evidencias genéticas y bioquímicas han apoyado la importancia de las familias de proteínas NF-Y y GRAS en diferentes procesos de desarrollo a lo largo del ciclo de vida de las plantas, así como en su adaptación a las condiciones ambientales adversas.

En la primera etapa de esta tesis, hemos generado un conjunto de datos de secuencias, estructuras génicas y patrones de expresión de genes que codifican las subunidades NF-Y en *P. vulgaris*, la leguminosa de grano más importante utilizado para el consumo humano directo. Las relaciones filogenéticas y los patrones de expresión generados constituyeron un punto de partida para dilucidar la función de PvNF-YA1/A9 en los programas morfogénicos de *P. vulgaris* que dan lugar a la infección rizobiana a través de los pelos radicales y a la organogénesis del nódulo. Mediante un análisis funcional por genética reversa pudimos evaluar el fenotipo de plantas con niveles alterados de *PvNF-YA1*. El silenciamiento de PvNF-YA1/A9 produjo una marcada reducción de los eventos de infección y resultó en un fenotipo no nodulante. Por otra parte, la sobreexpresión de *PvNF-YA1* reveló un fenotipo asociado a la selección o preferencia de la planta por cepas de *R. etli* más eficientes en la formación de nódulos. Estos resultados refuerzan el hecho de que además de los componentes del rizobio que determinan una mayor capacidad competitiva, la planta posee genes (e.j. *PvNF-YA1* y *PvNF-YC1*) cuya expresión coordinada es esencial para el establecimiento de un “diálogo molecular” especializado en las interacciones de mayor afinidad. Así, los estudios funcionales desarrollados en esta tesis constituyen una evidencia más de la implicancia de las subunidades NF-Y en la interacción leguminosas-rizobios.

Varios genes implicados en la vía de señalización de la nodulación han sido identificados mediante genética directa, análisis transcriptómico seguido de genética reversa, o mediante identificación de interactores por doble híbrido de levadura. El

capítulo III de esta tesis constituye un ejemplo de cómo nuevos componentes de la vía de señalización de la nodulación pueden ser identificados en base a la interacción física con una proteína que se sabe está involucrada en este proceso. PvNF-YC1 nos llevó a identificar a SIN1 como nuevo factor de transcripción involucrado en la morfogénesis de órganos laterales de la raíz de *P. vulgaris*. La asociación de una proteína GRAS de la subfamilia PAT1 a la simbiosis de raíz, sumados a las evidencias reportadas para NSP1 y NSP2, sugiere que las redes transcripcionales que regulan la formación de nódulos en las raíces, involucra una activación secuencial de diferentes miembros de esta gran familia de factores de transcripción. El análisis de SIN1 reveló que además de su función en la nodulación, posee una función importante en la elongación de las raíces laterales. Esta proteína con una función dual es una conexión interesante entre los programas de desarrollo de los dos órganos radicales: nódulos y raíces laterales. Teniendo en cuenta que las hormonas vegetales poseen una función clave en el desarrollo de ambos tipos de órganos, se plantea como una perspectiva interesante explorar la posible conexión de los factores de transcripción GRAS con el balance de auxinas y citoquininas, el cual es crítico durante la iniciación de las raíces laterales y los nódulos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de Cultivo y Soluciones

1.1. Medios de cultivo

1.1.1 Medio de cultivo para *Escherichia coli*, *Agrobacterium rhizogenes* y *Agrobacterium tumefaciens*:

LB Luria-Bertani	
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
Tryptona	10 g/l

El medio LB fue suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de cada cepa. Para el medio LB-sólido se adicionaron 15 g/l de agar.

1.1.2. Medios de cultivo para rizobios:

Medio YEM	
Extracto de levadura	0,4 g/l
Manitol	7,0 g/l
NaCl	0,1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g/l
K ₂ HPO ₄	0,5 g/l

Para el medio de cultivo YEM sólido, el medio fue suplementado con 10 ml/l de una solución acuosa de Rojo Congo 2,5 g/l y 15 g/l de agar.

1.1.3. Medios de cultivo para levaduras:

YPDA (<i>Yeast extract Peptone Dextrose Adenine</i>)	
Extracto de levadura	10 g/l
Peptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l
Adenina hemisulfato 0,2%	15 ml/l

SD (Minimal Synthetic Defined Base)	
Base nitrogenada libre de aminoácidos	6,7 g/l
Glucosa	20 g/l

El medio SD se complementó con el *dropout*, que contiene todos los aminoácidos excepto los de selección de los vectores o de los marcadores de la interacción en el ensayo de doble híbrido. En esta tesis se utilizaron los siguientes *dropouts*:

-Trp: sin triptófano, para mantener la selección del vector pGBKT7

-Trp-Leu: se empleó para la selección de los diploides transformados con pGBKT7 y pGAD-Rec.

-Trp-Leu-His: también denominado TDO (por Triple Drop Out): para selección de plásmidos e interacciones.

-Trp-Leu-Ade-His: también denominado QDO (por Quadruple Drop Out): para selección de plásmidos e interacciones.

El pH se ajustó a 5,8 y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C. Para medio sólido se agregaron 20 g/l de agar. Los medios sin histidina fueron suplementados con un inhibidor de la síntesis de este aminoácido, llamado 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole; Sigma Cat No. A-8056), con una concentración final de 10 mM a partir de una solución stock 1M, para evitar la selección de falsos positivos. Esta solución se prepara disolviendo el compuesto en agua bidestilada y se esteriliza con filtro 0,2 µm.

1.2. Soluciones empleadas

1.2.1. Antibióticos

Concentración de los antibióticos usados, tanto en medios líquidos como sólidos.

Antibiótico	Cultivos de <i>E. coli</i> (µg/ml)	Cultivos de <i>A. rhizogenes</i> (µg/ml)	Cultivos de <i>A. tumefaciens</i> (µg/ml)
Ampicilina	50	50	50
Cloranfenicol	35	120	150
Espectinomicina	50	200	-
Gentamicina	-	-	15
Kanamicina	50	50	50
Rifampicina	-	-	100

1.2.2. Medio Fahraeus

Solución mineral nutritiva para riego de las plantas

	Concentración de uso Soluciones 1000X
• CaCl_2	0,78 M
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,49 M
• Citrato férrico	0,02 M
• KH_2PO_4	0,74 M
• Na_2HPO_4	0,84 M
Micronutrientes	
• KCl	50 mM
• H_3BO_3	25 mM
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5,0 mM
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5 mM
• $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 mM
• $\text{Na}_2\text{MoSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0 Mm

Los micronutrientes se prepararon en una solución stock concentrada 1000 veces, la que se esterilizó a través de un filtro de 0,45 µm de poro.

En el caso de Fahraeus suplementado con fuente de nitrógeno se adicionó KNO_3 hasta una concentración final de 8 mM.

1.2.3. Solución para transformación de levaduras

LiAcTE 10X: Acetato de Litio 1M, Tris HCl 0,1M pH 8,0 y EDTA 10 mM pH 8,0.

1.2.4. Medios de conservación

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelamiento de alícuotas de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía que fueron luego suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final de 10 % (v/v). Las suspensiones de bacterias fueron congeladas a -80 °C y preservadas a esa temperatura.

2. Material biológico

2.1. Semillas

Las semillas de *P. vulgaris* cultivar NAG12 (Mesoamericano) fueron provistas por Susana García Medina (INTA, Estación Experimental Agropecuaria Salta, Cerrillos, Argentina). Las semillas de *N. benthamiana* fueron provistas por la Dra. Carina Reyes (Laboratorio de Virus vegetales, IBBM)

2.2. Cepas bacterianas

2.2.1. Cepas de *E. coli*

Cepa	Aplicación	Referencia
DH5α	Cepa utilizada para la multiplicación y mantenimiento de plásmidos.	(Taylor et al., 1993)
TOP10	Cepa provista por INVITROGEN para la transformación y mantenimiento de los vectores derivados de pENTRY/D-TOPO.	Invitrogen
ccdB survival 2 TR1	Cepa provista por INVITROGEN para la multiplicación y mantenimiento de los vectores destino del sistema GATEWAY portadores del gen <i>ccdB</i> .	Invitrogen

Las cepas de *E. coli* DH5 α , TOP10 y *ccdB survival* 2 TR1 fueron crecidas en medio LB líquido a 37 °C y 250 rpm de agitación, o en cultivos sólidos en placas de Petri con medio LB-agar.

2.2.2. Cepas de *Rhizobium etli* y *Agrobacterium*

Especie	Cepa	Referencia
<i>R. etli</i>	55N1 (polimorfismo <i>nodC</i> δ)	(Aguilar et al., 2004)
<i>R. etli</i>	SC15 (polimorfismo <i>nodC</i> α)	(Aguilar et al., 2004)
<i>R. etli</i>	CFNX5 DsRed (expresa la proteína fluorescente roja)	(Ripodas et al., 2013)
<i>A. rhizogenes</i>	K599	(Bond and Gresshoff, 1993)
<i>A. tumefaciens</i>	GV3101	(Hellens et al., 2000)
<i>A. tumefaciens</i>	GV3103	(Hellens et al., 2000)

Las cepas de *R. etli* se cultivaron en una primera etapa en medio YEM sólido con agregado de Rojo Congo y posteriormente en medio YEM líquido a 28 °C con agitación a 250 rpm.

Las cepas de *Agrobacterium* fueron crecidas inicialmente en medio LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes a 28 °C y posteriormente en medio LB líquido con los respectivos antibióticos a 28 °C con agitación a 250 rpm.

La cepa de *A. rhizogenes* K599 fue gentilmente cedida por el Dr. Federico Sánchez (Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México) y las cepas de *A. tumefaciens* por el Dr. Adreas Niebel (LIPMs, Castagnet-Tolosan, Francia).

Generación de células de *E. coli* DH5 α competentes químicas

A partir de un cultivo de *E. coli* DH5 α crecido durante toda la noche a 37 °C y 250 rpm, se realizó una dilución 1/100 y se dejó crecer hasta obtener una DO₆₀₀ de entre 0,8 y 0,9. Luego se centrifugó a 2600 $\times g$ durante 10 min y el precipitado fue resuspendido en

12,5 ml de la solución de transformación 1 (MOPS 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,0). Luego se procedió a una centrifugación a 2600 xg durante 2 min y el precipitado fue resuspendido en 12,5 ml de solución de transformación 2 (MOPS 100 mM, KCl 10 mM, $CaCl_2$ 50 mM, pH 6,5). Posteriormente se incubó la suspensión de células por 15 min en hielo, seguido de una centrifugación a 2600 xg durante 2 min. El sobrenadante fue removido, el precipitado de células fue resuspendido en 2,5 ml de solución 2, fraccionado en alícuotas de 50 μ l y guardado a -80 °C.

Transformación de células de *E. coli* competentes

A partir de alícuotas de *E. coli* TOP10 o DH5 α competentes, se realizó el protocolo de transformación descrito por (Sambrook, 2001). A las células competentes se les adicionó entre 1 y 2 μ l de la reacción de recombinación o del plásmido de interés y posteriormente la mezcla se incubó 30 min en hielo. Luego se procedió a realizar el tratamiento térmico a 42 °C por 30 seg seguido de 2 min en hielo. A continuación se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación (250 rpm). El cultivo fue centrifugado brevemente a 9500 xg durante 1 min. Finalmente el precipitado fue resuspendido en 50 μ l y plaqueado en medio LB-agar suplementado con el antibiótico requerido para la selección del plásmido de interés.

Generación de células electrocompetentes de *A. rhizogenes* K599 y *A. tumefaciens* GV3101/03

A partir de un precultivo de 5 ml de *Agrobacterium* saturado se inocularon 50 ml de medio LB que se incubó a 28 °C con agitación (250 rpm) hasta una DO_{600} de 0,7 - 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante aproximadamente 30 min y posteriormente se

centrifugó a 6000 *xg* durante 10 min. El precipitado fue resuspendido en 200 ml de glicerol 10 % (v/v), seguido de una centrifugación a 6000 *xg* durante 10 min. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 4 ml de glicerol 10 %, separado en alícuotas de 40 μ l y almacenado a -80 °C.

Transformación de células de *Agrobacterium* electrocompetentes

Las células competentes se transformaron mediante 1 pulso de electroporación a 2,5 kV, utilizando el equipo electroporador *Bio-Rad Gene Pulser* (BioRad) y cubetas de electroporación de 2 mm de espesor estériles y frías. En las cubetas se colocaron 40 μ l de bacterias competentes previamente mezcladas con 1-2 μ l del plásmido de interés e inmediatamente se procedió a la electroporación. Luego se agregó 1 ml de medio LB, y la suspensión bacteriana se incubó 1 h a 28 °C con agitación (250 rpm) para su recuperación. Finalmente la suspensión de células fue centrifugada brevemente a 6000 *g*, resuspendida en 100-200 μ l y plaqueadas en medio LB sólido conteniendo el/los antibiótico/s correspondiente/s.

3. Manipulación de ácidos nucleicos

3.1. Minipreparación de DNA plasmídico

A partir de una colonia bacteriana se inocularon 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente al plásmido de interés. Luego el cultivo fue incubado a 37 °C con agitación durante aproximadamente 12 hs y se obtuvo un precipitado de células por centrifugación a 6000 *xg* durante 10 min. A partir del precipitado se procedió a la

minipreparación de DNA plasmídico mediante la utilización del *kit Wizard Plus SV Minipreps* (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.2. Preparación de cDNA

3.2.1. Extracción de RNA total de tejido vegetal: El material vegetal se pulverizó en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Este tejido fue procesado inmediatamente, realizando la extracción de RNA con TRIZOL (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. Alternativamente, el RNA se extrajo con el *kit* NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo provisto por el proveedor. La resuspensión o elución del RNA se realizó con 50 µl de agua estéril y se almacenó a -80 °C hasta su utilización. La concentración de la muestra de RNA se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop2000 (Thermo Scientific) utilizando volúmenes entre 1 y 1,5 µl. La concentración de la muestra se calculó a partir de la A_{260} y se estimó su pureza a través de la relación A_{260}/A_{280} que en todos los casos fue cercana a 2. La integridad del RNA se analizó mediante una electroforesis no desnaturizante en geles de agarosa 1,2 % (p/v), visualizándose las bandas correspondientes al RNA ribosomal (ver sección 3.4).

3.2.2. Tratamiento del RNA con DNasa: para eliminar el DNA genómico que pudiera contener la muestra, 1 µg de RNA se digirió con 1 U de la enzima RQ1 DNasa libre de RNasa (Promega) utilizando el *buffer* suministrado por el fabricante, en un volumen final de 10 µl. Luego de incubar durante una hora a 37 °C se agregó 1 µl de EDTA 10 mM y se incubó durante 10 min a 65 °C para inactivar la enzima.

3.2.3. Síntesis de cDNA: la síntesis de la primera cadena de cDNA se realizó con 1 µg de RNA tratado con DNAsa como molde. Por cada µg de RNA se usaron 0,5 µg de oligo dT₁₅ como cebador. La mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C para eliminar la formación de estructuras secundarias del RNA y luego se mantuvo en hielo. A continuación se agregó una mezcla conteniendo 200 U/µl de transcriptasa reversa (MMLV RT, Promega), dNTPs 0.5 mM (Promega) y buffer 1X provisto con la enzima en un volumen final de 25 µl. La mezcla de reacción se incubó durante 90 min a 42 °C, temperatura a la cual tiene lugar la síntesis de cDNA, y finalmente 15 min a 65 °C para inactivar la enzima.

3.3. Reacciones de PCR

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl. La concentración final fue 2,5 µM de cada *primer*, 0,25 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgSO₄, 1 X *buffer* comercial para Taq polimerasa y 0,5 U de la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen). Las reacciones se llevaron a cabo en un ciclador térmico Mastercycler gradient (Eppendorf). El tiempo de elongación y la temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos utilizados fue variable para cada reacción. El programa estándar consistió en una primera etapa a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 52 °C (o T_m indicado) y 1 min por kb a 72 °C. Se incluyó una etapa final de 5 min a 72 °C.

3.4. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa

Las muestras con los fragmentos de DNA amplificados por PCR, la integridad y concentración aproximada del DNA plasmídico purificado, así como también la integridad del RNA, fueron analizados en geles de agarosa en un rango de 0,8 - 2 % (p/v), dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. El buffer de

corrida fue TBE 0,5 X (Tris base 45 mM, H_3BO_3 45 mM y EDTA 1 mM). A la mezcla agarosa/buffer se la suplementó con bromuro de etidio (BrEt) para visualizar el DNA por exposición a luz ultravioleta (UV). Para la siembra de las muestras en las fosas del gel se les agregó 1/6 volúmenes de *buffer* 6X de siembra para DNA (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromofenol 0,5 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en *buffer* TBE 0,5 X a voltaje constante (usando 10 V por cada cm lineal de gel). Para visualizar y documentar los perfiles electroforéticos se utilizó un transiluminador de UV (UVP) y una cámara digital Kodak. Para la captura de imágenes se utilizó el programa Kodak Digital Science v 2.0.3.

Los geles de agarosa para evaluar el control de la integridad del RNA fueron 1,2 % (p/v) en condiciones no desnaturalizantes, semejantes a lo descrito para evaluar las reacciones de PCR. La observación de bandas discretas correspondientes al RNA ribosomal fueron indicadores de la integridad del RNA para su uso como sustrato de reacciones enzimáticas.

3.5. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Cinco μl de una dilución 1/10 de la síntesis de cDNA fueron utilizados como molde en una reacción de PCR cuantitativa. La concentración de cada *primer* fue de 0,5 μM en un volumen final de 20 μl . Se utilizó la mezcla de reacción comercial *iQ SYBR Green Supermix* de BioRad. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad CFX96 Real Time System (BioRad). El protocolo de amplificación fue el siguiente: una primera etapa a 95 °C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 30 seg a 95 °C, 30 seg a 52 °C y 20 seg a 72 °C. Se realizaron dos réplicas técnicas, un control negativo sin cDNA para evaluar contaminación y una curva de calibración con diluciones seriadas del cDNA para cada par de oligonucleótidos utilizados. La posible dimerización de los oligonucleótidos o la amplificación de otros fragmentos fue analizada a partir de los resultados de las curvas de *melting*. La obtención de un único producto de amplificación

(de entre 100 y 200 pb) también se verificó por corrida electroforética en geles de agarosa. La normalización de los datos de expresión se realizó con el transcripto correspondiente al factor de elongación 1 α (*EF1 α*) de *P. vulgaris*, según fuera descrito previamente por Peltzer-Meschini (2008). Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad Prism V5.0 (GraphPad Prism Software).

4. Construcción de vectores mediante sistema GATEWAY

Para generar las construcciones de localización y/o sobreexpresión, los marcos abiertos de lectura de *PvNF-YA1* y *SIN1* fueron amplificados por PCR usando los *primers* *PvNF-YA1* OE F, *PvNF-YA1* OE R, *SIN1* ORF F y *SIN1* ORF R (Tabla S4), y clonados en el vector pENTR/D-TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante del kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Posteriormente se llevaron a cabo los clonados en los vectores de destino mediante recombinación utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen), de acuerdo a las instrucciones provistas.

Para la sobreexpresión de *PvNF-YA1*, en primera instancia se seleccionó el vector de destino binario GATEWAY p35S:HF-GATA, el cual permite la expresión del marco abierto de lectura como fusión a los epitopes FLAG y 6xHis en el extremo amino terminal bajo el control del promotor fuerte CaMV35S (Mustroph et al., 2009). El epitope FLAG permite detectar la sobreexpresión de las proteínas en las plantas transformadas mediante ensayos de *Western blot* utilizando anticuerpos anti-FLAG (sección 6.4). Luego la fusión FLAG-*PvNF-YA1* fue amplificada desde este vector utilizando *primers* específicos y subclonada en el vector de destino final pK7WG2D, el cual porta el gen que codifica eGFP bajo el control del promotor constitutivo *rolD* que permite discriminar las raíces transgénicas de las no transgénicas por visualización bajo luz UV. Como control de los ensayos de sobreexpresión se utilizó el vector vacío.

Para el análisis de localización subcelular de las proteínas PvNF-YA1 y SIN1 el vector de destino seleccionado fue pMDC43 (Curtis and Grossniklaus, 2003), el cual permite una fusión traduccional del marco abierto de lectura al extremo C-terminal de la proteína GFP bajo el control del promotor CaMV35S, dando lugar a las construcciones p35S:GFP-PvNF-YA1 y p35S:GFP-SIN1.

Para los ensayos histoquímicos de actividad glucuronidasa, un fragmento de 1.5 kb de la secuencia promotora de PvNF-YA1, fué clonada en el vector pENTR/D-TOPO y posteriormente subclonado mediante recombinación utilizando la enzima LR clonasa (Invitrogen) en el vector de destino pKGWFS7, que permite la fusión a GFP y GUS.

Las construcciones para localización, ensayos histoquímicos de GUS y sobreexpresión fueron introducidas en *A. tumefaciens* GV3101 y/o *A. rhizogenes* K599 mediante electroporación y luego utilizadas en la agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* o transformación de raíces de poroto, respectivamente.

Para el silenciamiento de *PvNF-YA1/A9* y *SIN1* mediante RNAi, se amplificaron por PCR un fragmento de 217 bp correspondiente a la región 3'UTR de *PvNF-YA1* y un fragmento de 397 bp correspondiente al extremo C-terminal de la región codificante de *SIN1*, utilizando *primers* específicos (Tabla S4) y cDNA de *P. vulgaris* como molde. Los productos de PCR fueron clonados en el vector de entrada pENTR/D-TOPO y recombinados en los vectores de destino compatibles pK7GWIWG2D(II) mediante tecnología Gateway (Karimi et al., 2002) para finalmente producir las construcciones *PvNF-YA* RNAi y *SIN1* RNAi. El plásmido control *GUS* RNAi fue previamente generado en el laboratorio (Blanco et al., 2009).

Para los ensayos de BiFC, los ORFs de *PvNF-YC1*, *PvNF-YA1* y *SIN1* se amplificaron con *primers* M13 a partir de los vectores pENTR/D-TOPO correspondientes y luego se recombinaron en los vectores pGPTVII.Bar.YN-GW y pGPTVII.Bar.YC-GW para obtener fusiones N y C terminales al fragmento N-terminal de la YFP, o alternativamente, al vector pGPTVII.Hyg.GW-YC para una fusión C-terminal al fragmento C-terminal de la YFP (Hirsch et al., 2009). Para los ensayos de ColP los

vectores pENTR/D-TOPO correspondientes a PvNF-YC1 y PvNF-YB7 se recombinaron en los vectores de destino PAM-PAT p35S:YFP:Gw (Baudin et al., 2015) para obtener fusiones a la proteína reportera YFP. Finalmente estas construcciones fueron introducidas en *A. tumefaciens* GV3103 para la posterior transformación de hojas de *N. benthamiana*.

5. Condiciones de cultivo, transformación de plantas de *P. vulgaris* e inoculación con *R. etli*

5.1. Esterilización y germinación de las semillas: las semillas se esterilizaron superficialmente con alcohol 96° durante 30 seg, seguido de inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (10 g/l) con agitación suave durante 10 min. Luego de 6 lavados con H₂O destilada estéril, las semillas se incubaron sobre papel húmedo durante 48 hs a 26 °C en oscuridad para su germinación.

5.2. Crecimiento de plántulas: las semillas germinadas fueron transferidas a pots plásticos conteniendo vermiculita previamente esterilizada y regadas con medio Fahraeus suplementado con microelementos y KNO₃ 8 mM (Figura 41). Las plántulas se mantuvieron en una cámara de cultivo Sanyo MLR-350HT a 26 °C, 80 % de humedad y un ciclo luz/oscuridad de 16/8 horas durante 5 días.

5.3. Crecimiento de *A. rhizogenes* K599: se cultivó en medio LB-agar suplementado con antibiótico de selección durante dos noches. A partir de este cultivo se cosecharon las células con espátula y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada estéril.

5.4. Obtención de plantas compuestas: se utilizaron plantas de aproximadamente una semana luego de la germinación (Figura 41A) siguiendo la técnica desarrollada por Estrada-Navarrete y colaboradores (Cook et al., 1995; Estrada-Navarrete et al., 2006). Se realizaron 3 inyecciones con jeringa Hamilton con 30 μ l de la suspensión de *A. rhizogenes* K599 en la zona de los cotiledones (Figura 41B). Las plantas se colocaron dentro de recipientes plásticos transparentes a fin de mantener condiciones de humedad saturante (Figura 41C) y se incubaron en la cámara de cultivo durante 15 días hasta que se observó el desarrollo de las raíces transgénicas (*hairy roots*, Figura 41D).

5.5. Crecimiento de plantas compuestas: una vez desarrolladas las raíces transgénicas en la zona de inoculación, el tallo fue cortado 1 cm por debajo del sitio de inyección y las plantas fueron transferidas a cajas de acrílico (17 cm. x 22 cm. x 4.5 cm) conteniendo medio agar Fahraeus inclinado sin KNO₃. Sobre el agar se depositó una hoja de papel para prevenir que las raíces atravesen el medio (Figura 41E). Las plantas se incubaron en la cámara de cultivo, en las condiciones descritas.

5.6. Inoculación de plantas de poroto con rizobios y recolección de tejido de raíz: a partir de estrías de las cepas de *R. etli* crecidas a 28 °C en placas de Petri con medio sólido YEM-RC, se inocularon precultivos de 5 ml que fueron incubados por 48 horas a 28 °C con agitación a 250 rpm. A partir de estos precultivos, se inocularon erlenmeyers conteniendo medio YEM (dilución 1/100) y los mismos fueron incubados en las mismas condiciones de crecimiento hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8 (fase exponencial tardía). En el caso de la cepa *R. etli* CFNX5 DsRed, se adicionó tetraciclina 4 μ g/ μ l, tanto en medio sólido como líquido, para mantener la selección del plásmido que porta el gen que codifica la proteína DsRed. Al cabo de 4 días de transferidas a las cajas acrílicas, las raíces de las plantas compuestas de *P. vulgaris* se inocularon en condiciones de

esterilidad con 5 ml de cultivo de *R. etli* o con medio YEM como control. Luego de 24 hpi, se realizó la recolección del tejido de raíz en nitrógeno líquido, para la posterior extracción de RNA y análisis por RT-qPCR de genes de interés. Por cada cepa utilizada, un mínimo de 7 plantas fue sujeto a un análisis fenotípico de nodulación durante 20 días. El tejido macerado se guardó a -80 °C hasta su utilización. En la figura 41F se muestran los nódulos desarrollados.

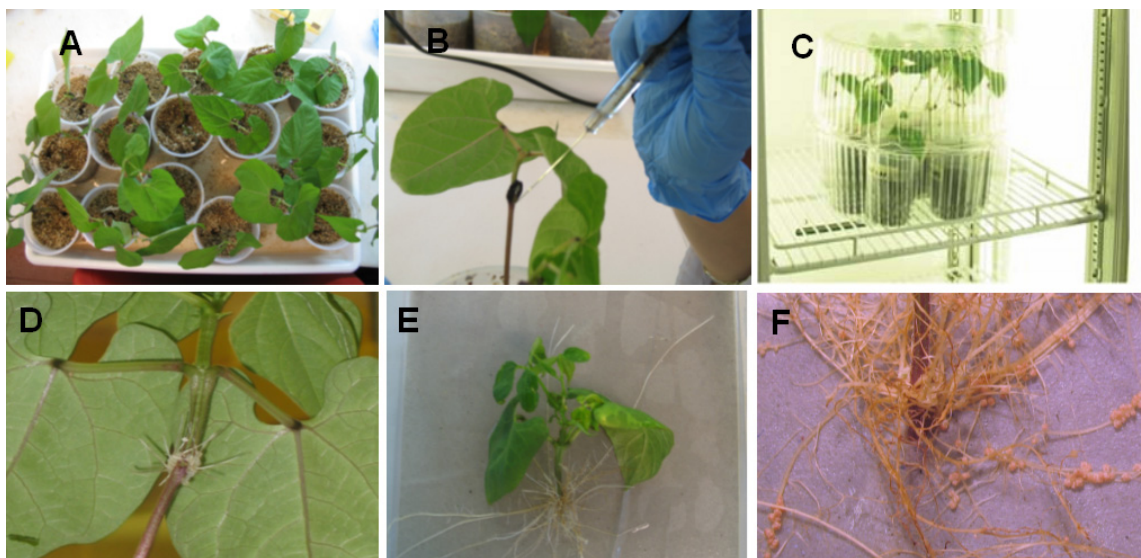


Figura 47: Obtención de plantas compuestas de poroto y su inoculación con *R. etli*

A. Crecimiento de plántulas. Las semillas germinadas se transfirieron a potes con vermiculita estéril. La foto corresponde a plantas de una semana luego de la germinación.

B. Transformación de plantas de poroto NAG12. Se inyectó tres veces con 30 µl de una suspensión de *A. rhizogenes* K599 en la base de los cotiledones utilizando una jeringa Hamilton.

C. Cámara de plantas. Para mantener la humedad saturante se colocó en recipientes plásticos sellados con film adherente. Las plantas se mantuvieron en cámaras de cultivo con temperatura y luz controladas durante el ensayo.

D. Desarrollo de hairy roots. Primeramente se desarrolla un callo en la zona de inyección, a partir del cual emergen las raíces transgénicas.

E. Corte de la raíz salvaje y transferencia a cajas plásticas. Aproximadamente 2 semanas después de la transformación, las raíces transgénicas se encuentran bien desarrolladas. Se realizó un corte de 1 cm por debajo del cotiledón para remover la raíz salvaje y la planta se transfirió a cajas con agar Fahraeus inclinado.

F. Nódulos formados luego de la inoculación. Utilizando las cajas plásticas transparentes es posible contabilizar los nódulos por raíz a lo largo del tiempo. La foto corresponde a 14 dpi.

6. Análisis de la expresión del transgen y las fusiones a GFP mediante Western blot

6.1. Extracción de proteínas totales

A partir de tejido de raíz de plantas compuestas individuales de *P. vulgaris* u hojas de *N. benthamiana* pulverizadas en nitrógeno líquido se homogenizaron 100 mg de tejido con 200 µl de buffer de siembra 3 X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v), azul de bromofenol 0,02 mg/ml). Para la desnaturalización de las proteínas las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min. Luego se precipitaron los restos celulares por centrifugación a 17000 xg durante 10 min a 4 °C.

6.2. Separación de proteínas por SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de SDS-poliacrilamida al 12 % (p/v) de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook, 2001) utilizando el Mini PROTEAN System 3 (Biorad). La electroforesis fue realizada en buffer Tris-Glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 % (p/v)), con una corriente constante de 25 mA por gel durante aproximadamente 1 h.

6.3. Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa *Hybond C* (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando el sistema de transferencia Mini Trans-Blot Cell (BioRad) y *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 150 mM pH 8,0, metanol 20 %) con un voltaje constante de 100 V durante 60 min. La presencia de las proteínas en las membranas de nitrocelulosa y la carga de proteínas en cada calle se evaluó por tinción de la membrana con una solución de Rojo Ponceau 0.5 % (p/v)

preparada en ácido acético 1 % (v/v). Luego se realizaron sucesivos lavados con agua para eliminar el colorante.

6.4. Inmunodetección y revelado por quimioluminiscencia

Las membranas fueron incubadas durante una noche a 4 °C con una solución bloqueante de leche descremada en polvo 5 % (p/v) en buffer PBS-T (las siglas de PBS-T provienen de *Phosphate Buffered Saline with Tween 20*; la composición del buffer 1 X es: Na₂HPO₄ 3,2 mM, KH₂PO₄ 0,5 mM, KCl 1,3 mM, NaCl 135 mM, Tween 20 0.05% (v/v), pH 7,4). Luego de descartar la solución de bloqueo y realizar diversos lavados con PBS-T, se agregó el anticuerpo primario diluido en TBS-T y se incubó a temperatura ambiente durante 90 min con agitación suave. Para la inmunodetección de proteínas fusionadas al epítopo FLAG se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-FLAG conjugado a la enzima peroxidasa (HRP) (1:500, Sigma-Aldrich). Para la inmunodetección de proteínas fusionadas a GFP o YFP se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-GFP conjugado a HRP (1:5000; Invitrogen). Posteriormente, se realizaron 5 lavados de la membrana con PBS-T 1X de 5 min cada uno. Para el revelado de las membranas se utilizó el sistema de revelado basado en la oxidación del luminol mezclando en volúmenes iguales las soluciones preparadas con luminol (en DMSO) 250 mM, ácido cumárico 90 mM, H₂O₂ 30 vol, buffer Tris HCl 1M pH 8,5. Inmediatamente las membranas fueron expuestas a placas radiográficas durante aproximadamente 1 hora siguiendo las instrucciones del proveedor (Amersham Pharmacia Biotech) o bien la quimioluminiscencia fue detectada con un adquisidor de imágenes (UVP Biolimaging System).

7. Caracterización fenotípica de las plantas compuestas

7.1. Cinéticas de nodulación: se cuantificó el número de nódulos en las plantas inoculadas desde el momento de su aparición (estadio de primordio, 4-5 dpi) hasta el estadio de nódulos maduros (18-20 dpi). Teniendo en cuenta que cada raíz transgénica es un evento de transformación independiente, los nódulos se cuantificaron por raíz. Se incluyeron plantas sin inocular en todos los casos, como control del experimento de inoculación. Se analizaron alrededor de 50 raíces transformadas con cada construcción frente a la inoculación con SC15 o 55N1 tomando un número de plantas superior a 20. Se realizaron tres experimentos independientes.

7.2 Determinación de peso seco: la formación de biomasa en la variedad mesoamericana NAG12 fue estimada mediante determinación del peso seco de la parte aérea de las plantas, comprendiendo el tallo desde la corona y el follaje. El experimento incluyó también plantas no inoculadas. Las plantas fueron cosechadas a los 28 días luego de la inoculación con rizobios. La parte aérea de cada una de seis plantas ensayadas para cada tratamiento fue incubada en estufa a 80 °C hasta alcanzar un peso constante. El peso seco fue determinado en una balanza analítica (Ohaus Pioneer, resolución 1 mg).

7.3 Medida de la longitud de raíces y densidad de raíces laterales: la determinación de estas medidas se llevó a cabo sobre fotos de las plantas tomadas al momento de la inoculación utilizando herramientas incluidas en el programa Adobe Photoshop 7.0 y/o directamente sobre plantas crecidas en vermiculita regadas con solución Fahraeus suplementada con nitrato. Para la medición de la longitud de la raíz principal se analizaron 5 raíces por planta y 10 plantas por cada construcción. Se midió desde la interfase con el tallo hasta la punta de la raíz. En el caso de las raíces

laterales la medida se tomó desde la interfase con la raíz principal hasta la punta de la raíz. Por último, para la determinación de la densidad de raíces secundarias se tomaron 5 raíces por planta y se cuantificó el número de raíces laterales presentes por centímetro de raíz.

7.4. Determinación del tamaño de los nódulos: se inocularon plantas NAG12 crecidas en vermiculita con las cepas SC15 y 55N1. Luego de 30 días, las raíces se enjuagaron en agua corriente para retirar la vermiculita y se fotografiaron. Se usaron entre 4 y 5 plantas por variedad y cepa de rizobio. El diámetro de los nódulos se midió a partir de la imagen empleando herramientas del programa Adobe Photoshop 7.0.

7.5. Cosecha de distintos órganos de plantas de poroto: las hojas, tallos y raíces de plantas de poroto WT de 7 días post-germinación no inoculadas se cosecharon por separado, se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron con ayuda de un mortero. El material resultante se almacenó a -80 °C hasta su uso. Del mismo modo se procedió con nódulos de 7 y 14 dpi formados en las raíces de poroto NAG12 WT por las cepas SC15 y 55N1; y con raíces WT y transgénicas a las 24 hpi con el rizobio.

7.6. Ensayos de coinoculación y análisis de polimorfismo del gen *nodC*: plantas compuestas control y FLAG-PvNF-YA1 fueron transferidas a potes con vermiculita conteniendo medio Fahraeus sin KN_3 e incubadas por 9 días en domos de plástico de acuerdo al protocolo estandarizado para ensayos de coinoculación de raíces de *P. vulgaris* en cámara de crecimiento (Aguilar et al., 2004). Los cultivos de las cepas SC15 y 55N1 se incubaron por separado a 28 °C con agitación (250 rpm) hasta obtener una OD_{600} de 0,8 y posteriormente los cultivos se mezclaron en una relación

1:1 de ambas cepas. Diez plantas compuestas por cada construcción analizada se inocularon con 5 ml de la mezcla de cultivos y se incubaron en los domos de plástico en la cámara de crecimiento. Veintiún días después de la coinoculación, se cosecharon con bisturí aproximadamente 100 nódulos provenientes de las plantas compuestas de cada construcción y se procesaron para la extracción de DNA bacteriano. Los nódulos se esterilizaron con alcohol 96 % por 30 seg, seguido de una incubación en H₂O₂ 30 vol por 4 min y de 6 lavados con H₂O estéril. Posteriormente, los nódulos fueron macerados individualmente en 10 µl de H₂O estéril. Finalmente, la solución de bacterias se sembró en una placa de Petri conteniendo medio YEM-RC. Luego de la incubación durante 3 días a 28 °C, se tomó una muestra de bacterias provenientes de cada nódulo y se resuspendió en 200 µl de NaCl 1M. Las bacterias se precipitaron por centrifugación a 17300 *xg* durante 2 min, se lavaron con 200 µl de H₂O estéril, y se centrifugaron nuevamente a 17000 *xg* por 2 min. El precipitado se resuspendió en 200 µl de resina Chelex 6 % p/v (Bio Rad) y se incubó a 56 °C por 8 min seguido de una incubación a 99 °C por 10 min. Las muestras fueron posteriormente centrifugadas a 17300 *xg* por 2 min y el sobrenadante conteniendo el DNA bacteriano se utilizó para el análisis del polimorfismo del gen *nodC* mediante amplificación por PCR y análisis de restricción con la enzima de restricción *HinfI* (Promega) según el protocolo descrito previamente (Aguilar et al., 2004). Los *primers* utilizados se encuentran en la Tabla S4. Los productos de la digestión con la enzima *HinfI* se analizaron por electroforesis en geles de agarosa 1 % (p/v) no desnaturizantes (ver sección 3.4).

8. Ensayos de localización subcelular y complementación bimolecular por fluorescencia (BiFC)

La cepa *A. tumefaciens* GV3101 fue transformada por electroporación con las construcciones correspondientes. Cultivos de estas bacterias conteniendo cada construcción y el plásmido con la proteína supresora P19 (Voinnet et al., 2003) fueron incubados durante una noche a 28 °C. Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y luego los precipitados se resuspendieron en 5 ml de Agromix (MgCl₂ 10 mM, MES/KOH 10 mM, pH 5.6 y acetosiringona 150 mM) y se incubaron a temperatura ambiente por dos horas. Posteriormente, las suspensiones se diluyeron utilizando Agromix hasta una OD₆₀₀ de 1.

En el caso de los ensayos de localización subcelular se mezclaron volúmenes iguales del cultivo de la proteína P19 y de las fusiones GFP-PvNF-YA1 o GFP-SIN1. En los ensayos de BiFC, las diferentes combinaciones a testear junto con la proteína P19 fueron preparadas mezclando volúmenes iguales de cada cultivo, diluyendo hasta obtener una DO₆₀₀ final de 0,25. Las combinaciones de *A. tumefaciens* fueron agroinfiltradas en hojas de *N. benthamiana* utilizando una jeringa sin aguja como fue descrito previamente (Voinnet et al., 2003). La observación de la fluorescencia se llevó a cabo entre 50 y 70 horas luego de la agroinfiltración.

9. Ensayos de actividad β -glucuronidasa

Raíces de *P. vulgaris* y nódulos formados a los 7 y 14 dpi con la cepa de *R. etli* CFNX5 Ds-Red, donde se determinó la actividad de la enzima β - glucuronidasa (expresión del gen *uidA*, GUS), fueron cortados en secciones de 2 cm aproximadamente y luego fueron infiltrados con una solución del reactivo colorante (TRIS-HCl 100mM pH 7, X-

Gluc 2 mM (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil- β -D-glucuronic acid cycloheximide), Tritón-X100 0,01 % v/v, NaCl 50 mM, ferrocianuro de Potasio 2,0 mM) e incubados a 37 °C durante 1-10 horas, para posteriormente ser analizado mediante microscopía de campo claro o lupa.

10. Observaciones macroscópicas y microscópicas

La observación del sistema radical para identificar las raíces transformadas que expresan la proteína fluorescente verde GFP se realizó en una lupa Leica MZFLIII (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes adquiridas en los campos visibles e irradiados con luz UV se digitalizaron con el programa Image-Pro Plus 5.1 (Inc. MD, U.S.A.). Esta misma lupa se utilizó también para analizar los nódulos formados a los 7 y 14 dpi del ensayo de actividad de β -glucuronidasa.

El seguimiento de la formación de hilos de infección (ITs) y la ocupación de nódulos por la cepa de *R. etli* marcada con DsRed se realizó con un microscopio invertido Olympus IX51 utilizando luz blanca y UV con filtros apropiados (Olympus Corporation, Shinjuku Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara Q-Color3 de alta resolución (Olympus Corporation).

Para obtener secciones semifinas de los nódulos de *P. vulgaris* se utilizó el servicio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, siguiendo el protocolo descrito previamente (Zanetti et al., 2010). Secciones de 1-2 mm se tiñeron con azul de toluidina 0,04 % y se examinaron con un microscopio gay Olympus IX51 (Olympus Corporation).

La microscopía confocal de raíces de *P. vulgaris*, hojas de *N. benthamiana* y la observación de ITs fue realizada con un microscopio confocal Leica (SP5) con objetivos 20X y 40X. Las muestras se excitaron con láser de Argón y los espectros de emisión utilizados para detectar las fluorescencias fueron los siguientes: GFP (498nm - 550nm) y DsRed (578nm - 626nm). Las imágenes fueron capturadas por la cámara del

microscopio con el programa *Leica Application Suite* (Leica) (servicio provisto por la plataforma de microscopía avanzada PMA-FCEN, de la Universidad Nacional de La Plata).

11. Ensayos de co-inmunoprecipitación

Las cepas *A. tumefaciens* GV3101 y GV3103 fueron transformadas por electroporación con las construcciones correspondientes. La agroinfiltración de hojas de *N. benthamiana* se realizó como fue descrito en la sección 8 para los ensayos de BiFC. La recolección del tejido en nitrógeno líquido se llevó a cabo entre 50 y 70 horas luego de la agroinfiltración.

A continuación, se extrajeron los complejos proteicos provenientes de 100 mg de hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas utilizando un buffer de extracción (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, glicerol 10 % (v/v), EDTA 1 mM, Triton X-100 0,1 % (v/v), CaCl₂ 5 mM) suplementado con polivinilpolipirrolidona (PVPP) 2 % (p/v) y un cóctel inhibidor de proteasas 1,65 % (v/v) (Sigma-Aldrich). Después de 30 min de incubación a 4 °C con agitación, el extracto se clarificó por centrifugación a 2400 xg durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se mezcló con 40 µl de resina anti-FLAG conjugada a agarosa (Sigma-Aldrich) y se incubaron en un agitador durante 1,5-2 hs a 4 °C. Después de una centrifugación a 17000 g, los co-inmunoprecipitados se lavaron seis veces con 1 ml de buffer de extracción sin PVPP y posteriormente se incubaron en buffer de elución (péptido 3X FLAG Sigma-Aldrich con una concentración final de 200 ng/µl en buffer de extracción sin PVPP) durante 10 min a 4 °C. Las mezclas se centrifugaron y el sobrenadante se recuperó como los eludíos de las coimmunoprecipitaciones. Como se describe en la sección 6, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se detectaron por inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-FLAG (1:500; Sigma-

Aldrich) o anti-GFP (1:5000; Invitrogen). Una alícuota del extracto crudo se sembró como control de entrada (*input*) en el inmunoblot.

12. Ensayo de doble híbrido por retransformación de levadura

El ORF completo de *SIN1* fue recombinado en el vector pGADT7-Rec (Clontech) y transformado en levaduras AH109. Versiones truncadas de PvNF-YC1 fueron previamente generadas y clonadas en fase en el vector pGBKT7 (*bait*) y transformadas en Y187 por la Dra. Battaglia (Battaglia et al., 2014). El *screening* se realizó por apareamiento (*mating*) de las levaduras en escala pequeña, siguiendo el protocolo indicado en el manual de Clontech. Las levaduras se crecieron en los medios mínimos SD correspondientes. Colonias de cada par de construcciones a testear fueron colocadas en un mismo tubo conteniendo 0,5 ml de medio YPD y se dejaron a 30 °C durante una noche con agitación a 200 rpm. Posteriormente se plaquearon 100 µl de estos cultivos en los medios mínimos SD apropiados. Se utilizó el doble *dropout* Trp Leu para la selección de los diploides transformados y el cuádruple *dropout* TLAH (QDO) para seleccionar los diploides en los que se produjo una interacción positiva. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3-5 días para permitir que las células diploides formen colonias visibles.

Los controles fueron realizados a partir de las construcciones provistas por el proveedor (Clontech). Colonias de AH109 conteniendo el plásmido pGADT7 con la proteína correspondiente a la proteína de fusión con el antígeno T fueron apareadas con la cepa Y187 transformada con pGBKT7-Lam, que codifica una proteína de fusión con laminina como control negativo de interacción o con Y187 conteniendo pGBKT7-53, que codifica una proteína de fusión a p53, como control positivo de interacción. Los *mating* resultantes fueron plaqueados en medio SD-Leu-Trp y en QDO.

13. Actividad β -galactosidasa

Los ensayos de medida de la actividad β -galactosidasa se realizaron usando *orto*-Nitrofenil- β -galactosido (ONPG) como sustrato, siguiendo las indicaciones provistas en el Yeast Protocols Handbook (Clontech). Cultivos de 5 ml en medio de selección SD líquido (SD-Trp-Leu), para mantener la selección de los plásmidos utilizados, se incubaron durante dos noches. El día del experimento, se preparó una solución de ONPG en *buffer* Z de 4 mg/ml. Se transfirieron 2 ml de cada cultivo a 10 ml de YPD y se incubaron a 30 °C durante 3-5 horas con agitación (230-250 rpm) hasta que las células alcanzaron la fase semilogarítmica (OD_{600} : 0,5-0,8). Se centrifugaron tres alícuotas de 1,5 ml de cultivo a 10000 xg durante 30 seg y las células se resuspendieron en 300 μ l de *buffer* Z. Posteriormente se transfirieron 0,1 ml de las suspensiones celulares a nuevos tubos de microcentrifuga, los cuales se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación (nitrógeno líquido/baño a 37 °C) para lisar las células. Posteriormente se añadió 0,7 ml de *buffer* Z + β -mercaptoetanol 0,3 % (v/v) a cada reacción y a los tubos blanco e inmediatamente se añadieron 160 μ l de la solución de ONPG a cada tubo. Estos se colocaron en una incubadora a 30 °C y se comenzó a tomar el tiempo. A medida que los diferentes tubos iban desarrollando el color amarillo, se añadieron 0,4 ml de Na_2CO_3 1M a la reacción y a los tubos en blanco. Posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 10000 xg para sedimentar los restos celulares y finalmente el sobrenadante se transfirió a cubetas para medir su OD_{420} . Una unidad de β -galactosidasa se define como la cantidad que hidroliza 1 μ mol de ONPG a *o*-nitrofenol y D-galactosa por min por célula. A partir de esto la actividad β -galactosidasa fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades } \beta\text{-galactosidasa} = 1,000 \times OD_{420} / (t \times 0.5 \times OD_{600})$$

t = tiempo transcurrido (en min) de incubación

$$OD_{600/420} = A_{600/420} \text{ de 1 ml de cultivo}$$

14. Análisis bioinformáticos

14.1. Bases de datos de secuencias genómicas

Se utilizó la base de datos genómica de *P. vulgaris* v1.0, *M. truncatula* 4.0v1 y *G. max* Wm82.a2.v1 disponibles públicamente en *Phytozome* v10 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y la base de datos genómica de Arabidopsis TAIR (*The Arabidopsis Information Resource* -<http://www.arabidopsis.org>).

14.2. Mapeo cromosómico y análisis de sintenia

La posición física de los miembros PvNF-Y fue mapeada en los cromosomas de *P. vulgaris* utilizando la función *Map-view* del sitio web *Plant Genome Duplication Database* (PGDD). La función *Locus Search* disponible en este mismo sitio permitió identificar la regiones sinténicas (regiones colineares) conteniendo los *loci* de PvNF-Y (Lee et al., 2013).

14.3. Análisis de secuencias nucleotídicas y proteicas

- *BlastX* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): se compararon las secuencias de los clones analizados contra la base de datos no redundante (nr) para obtener las secuencias homólogas.

tBlastn: las secuencias nucleotídicas de cada familia PvNF-Y se identificaron mediante una búsqueda contra la base de datos genómica de *P. vulgaris* utilizando como *queries* las secuencias aminoacídicas completas de los 30 miembros NF-Y de *Arabidopsis thaliana* disponibles en TAIR.

- *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>): programa usado para el alineamiento de secuencias de proteínas a través del algoritmo *neighbor-joining*.

- *BOXSHADE* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html): Programa usado para dar formato a los alineamientos obtenidos del *ClustalW*.

- Vector NTI (Invitrogen, www.lifetechnologies.com): Programa utilizado para analizar mapas de vectores y diversos análisis de secuencias. También se utilizó para identificar la presencia de marcos de lectura *upstream* (uORFs) en miembros de la familia PvNF-YA, utilizando un tamaño de ORF ≥ 60 nucleótidos (nt).

14.4. Análisis filogenético de los miembros NF-Y

El análisis filogenético de los distintos miembros NF-Y de *P. vulgaris* y de esta planta junto con los miembros de *A. thaliana*, *G. max* y *M. truncatula* fue realizado con el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011) a partir de los alineamientos obtenidos con ClustalW (Thompson et al., 1994). Las relaciones entre las secuencias fueron inferidas utilizando el método *neighbor-joining* y la opción de *bootstrap* con 1000 repeticiones. Los árboles filogenéticos fueron diagramados en una escala definida por las distancias evolutivas con el programa MEGA5. Las distancias evolutivas se consideran como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

PvNF-YA9	1	-----
PvNF-YA3	1	-----
PvNF-YA8	1	-----
PvNF-YA4	1	-----
PvNF-YA5	1	-----
PvNF-YA7	1	-----
PvNF-YA6	1	-----
PvNF-YA2	1	-----
NF-YA_Mouse	1	MEQYTTNSNSTEQIVVQAGQIQQQGGVTAVQIQTHAQVASASGQQVQTIVQVVGQPIIM
PvNF-YA1	1	-----MAMQTVYIKKHEGNAIPNFVCAISSASAP-----WWSAHGSAVH
PvNF-YA9	1	-----MQTAYLKEHEGIVINSVGLSSSTASAP-----WNLGLSSQFVC
PvNF-YA3	1	-----MNCLEKDCGLFSSSTSPNVLCGPSWGPSE-----SRSLSLKVD
PvNF-YA8	1	-----MKNLIEKSGS-----STITLAPYATGCTSWGTSSESNV-----QQSSMSRGLTLKMSV
PvNF-YA4	1	-----MKPFLISNR-----
PvNF-YA5	1	-----MPSKSETANQPRSNPISFAPNNVYSEFPWRGIGYNS-----VPQAMSGVNASSSS
PvNF-YA7	1	-----MQSKSETANRLRSDPHSFQPGSVYSEFPWRGIGYNP-----LAQTMAGANASSSS
PvNF-YA6	1	-----MPCKPDTDD-----WHEQIQFHP-----WWR-----AVGENASSSS
PvNF-YA2	1	-----VTSAHNITDNEDDGGQSKSKSVQSPSANISDSG-----
NF-YA_Mouse	61	VQSGGQITSTGQPTIMVQAVFGGQQTITMVPVSGTQGLQIQILVPPGQIQIQIGCAVQ
PvNF-YA1	41	CGESCVMKPFSLLELPNCIDQHAVNKPSARGAEHVLGKGHTTQFTI-----
PvNF-YA9	39	G-DYCGGSKPFSLEFSNYVDQIAG-----
PvNF-YA3	42	QPQQCHRIKTLSPQFQELDSSSTHS-QSSSTKLGSSSQGMSVEHS-----STDSTHC--
PvNF-YA8	49	LPQQCHKIKPLNFQYQDRDSSSSQSTGQSYQEVGSAQSGQISVQCSNSSACSTINTTGRK
PvNF-YA4	10	-----
PvNF-YA5	52	LERPNDSSESSED-QSLSNNGVNEEDDDATKESOPTAPNQAGNYGQ-----
PvNF-YA7	52	LECPNDSSESNEEGQSLSNSGMNEEDDDATKDSQPAAPNEPCNYGQ-----
PvNF-YA6	33	ADQLNGSS-----SVPGTDKTTGGCAAK-----
PvNF-YA2	35	-----
NF-YA_Mouse	121	VQCGGQITQQIIQQPQTAVTAGQTQTQQQIAVQCGQVAQTAEGQTIVYQPVNADG----
NF-YA1	87	----FPIDCKUSDEAOTLOITISLOPSLADSHSRFEIGFSOPMTICAKYFYTDQFYG----
NF-YA9	62	----IDCKMLGQGNPBAFLAPQSSVAEPNNHLELGNQPMICAPYPCMDQFCG----
NF-YA3	94	----IRSEFMGNQDFTFPPPLILHSCILAHIGHYDPGYSSLMASSYGSQFKHEDQKNIT
NF-YA8	109	SVEGATRSVVRGQDFTFPPPLILHSCILAHIGHYDPGYSSLMASSYGSQFKHEDQKNIT
NF-YA4	10	----IDTMYNCSQVTFSSHMAHTPYPCADPYFASSLVAYAEQAIN-----
NF-YA5	97	----IHQAMLHSSISAPERRDCLIHAPQLELIGHS-----
NF-YA7	98	----EQGCIQHTASSAPEMRECLIQTPQLELVGHSIACATNPYQDQVYGSMMAVYGH
NF-YA6	55	----HYQNKIDMSIIFETMEKILAPNPITEFVCHS-VVLTSPYLDQYQCMILTTYGQ
NF-YA2	35	----ISTQNVNVQYATPGQLGAGHAMVPPVYPDPYYSIFAPYDTQPPYPPQAYSG-
NF-YA_Mouse	177	TTIQVTVPVSGMTTPAASTAGAQIVQTGANTNTSSGQGTIVTTLFVAGVNVNSGGM
PvNF-YA1	139	---FSAYAPQISGRIMLPINMTSDGFTVYNAKQYHGTIRRRQSRAKAVIHKKITKRRK
PvNF-YA9	112	---FVSAYGQIPIGRIMLPINMASDGFYVYNAKQYHGTIRRRQSRAKAVLENKMKRRK
PvNF-YA3	149	DETPNVQFVETAPITRIPLDITTEE--PIYVNSKOYHAILRRRCNRAKLEQNKIKDRK
PvNF-YA8	160	PNTHPAQLIGVATARIPLPLDLEE--PIYVNAKQYHAILRRRCYRAKLEQNKIKERK
PvNF-YA4	51	QPQITPQMGASTRTALPVLATFG--PIYVNAKQYHGTIRRRQSRAKLEQNKIKRSK
PvNF-YA5	129	---FGYAPFTGPHARMALPLEMAE--PIYVNAKQYHGTIRRRCARAKAELEKLIKVRK
PvNF-YA7	152	QQTGYPPRTGPHARMPLPLEMAE--PIYVNAKQYHGTIRRRCARAKAELEKLIKRSK
PvNF-YA6	108	QVMNPLPYGPHARMALPLEMAE--PIYVNAKQYHGTIRRRQSRAKAELEKLIKVRK
PvNF-YA2	88	QPMVHLQMLGQCGVPLPTEAVEE--PIYVNAKQYHGTIRRRQSRAKAELEKLIKVRK
NF-YA_Mouse	236	VMMVPGAGSVPAIQRIPLPGAEMLEEBPIYVNAKQYHGTIRRRCARAKLEQNKIKERK
PvNF-YA1	196	PYMHESRHLHAMRRERGCGGRFLNTRKSAANGKGTGNVHETVGERLHSSGSQSSEFLQS
PvNF-YA9	169	PYMHESRHLHAMRRERGCGGRFLNTRNSSNENGNDVGNQMGGQLFLSSASQSEMMS
PvNF-YA3	207	PYLHESRHLHATRRARGAGGRFLNTKKIQSSTRT-----RGNTAES
PvNF-YA8	218	PYLHESRHLHAMRRARGSGGRFLNTKKIEESKPTSANHAADVSSCTRLN---LRGNMES
PvNF-YA4	110	PYLHESRHLHATRRARGSGGRFLSAKQIQESNSEHVENTHSGPGPVKVY---QKKDASEV
PvNF-YA5	185	PYLHESRHLHAMRRARGCGRFAKKTVEA-SSHTNKKD-----MGAGPV
PvNF-YA7	210	PYLHESRHLHATRRARGCGRFAKKSDAEG-SNNSGKDKDNGTDSVLSSQSISSSGSEPL
PvNF-YA6	166	PYLHESRHLHATRRARGCGRFLNTKKIENSSDITSEKGN-----NGGANP
PvNF-YA2	146	PYLHESRHLHAMRRERGCGGRFLNKKKEENHNDVASAEKS-----
NF-YA_Mouse	296	KYLHESRHLHAMRRERGCGGRFLNKKES-----
PvNF-YA1	256	EAGTLNISKETNGSSPNISGSEVTSMYSRGGLERFSLNHFG-----
PvNF-YA9	229	DVG-MHSPMETDQYSPNMSSEVSSMYSREGFDGFSVHPLGSSSVHPLGSSSVHPLGSSS
PvNF-YA3	240	S---MHQMKNYRDGD-----DNATYASNSD-----
PvNF-YA8	275	RRVVLVEKLNRYRDGASTTSSDITTHASNSGDVFGQHQSEFRLCGYPS-----
PvNF-YA4	167	ES--HPSRTVENACITFTATISGLTSMSSSNLNFQRP-----
PvNF-YA5	230	PSDSAKVWNSPVSQDITRESQ-VHERFGKHNYAN---VLQ-----
PvNF-YA7	269	HSDSAETWNSPVMQDARAANKVHNREAPGYQNGSGAYHNHHL-----
PvNF-YA6	213	STNSFHLHLVLSNNENLGSSEKTVQDMHRVQSFN---GYHNENG-----
PvNF-YA2	187	-----QNNINLNSDKNDQTSDDTS-----
NF-YA_Mouse	326	-----PHMQDENQADEEAMQITIRVS-----
PvNF-YA1	297	-----SSVHTLVDMIDG-----GRGMIIPTKWAAAAGNCCNLKV-----
PvNF-YA9	288	VHPLGSSVHSIADMIGS-----GNCITMPTRWA-----
PvNF-YA3	270	-----ARNQNHSTSKGG-----GTQOQHPLEVY-----
PvNF-YA8	322	---HIGRNQGYSSDMGG-----GGGNQHRLSVLM-----
PvNF-YA4	201	---EHNFLGNSSNKGSSQCSGGLSFGGGRQRCASVGR-----
PvNF-YA5	266	---SSSAFCLHSGERV-----EEGVCSSGQSGSISSEQTSQRRLAIQ-----
PvNF-YA7	313	---QSSVYHSSSGERV-----EEGVCSSGQQLNHN-----
PvNF-YA6	254	---LTAIYLPQVNGKK-----ERDPLGAFK-----
PvNF-YA2		-----
NF-YA_Mouse		-----

Figura S1. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas completas de la familia PvNF-YA.

Alineamiento múltiple de las proteínas completas NF-YA de *P. vulgaris* y ratón. El análisis se realizó utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Los residuos negros representan aminoácidos idénticos, mientras que los grises indican sustituciones conservativas.

PvNF-YB12	1	-----MAGVREQD
PvNF-YB13	1	-----MD-QFFQD
PvNF-YB10	1	-----MEDSYCGSSSKDKNCS-IKEQD
PvNF-YB11	1	-----MLSWSTKRVVQLLELNSFLP-----KMVDNVCGSSSNPENSQ-TREQD
PvNF-YB6	1	-----MGDNIN-IGKVLDRREGFKY-----SFTSSATATASDTSEQDGVIREQD
PvNF-YB8	1	MMEDENHATLPNAYNSGSPESPCLKTNTNINNNINPTTHNNNNHNNNNNNNNHNNKEQD
PvNF-YB9	1	-----MEDESHTNLPNAFITASPEPSLKPSN-----NTTTTNT-----HHHNNNN-----KEQD
PvNF-YB3	1	-----MAESDNDSSGGQ-----AGNNCGNEFS-----GCREQD
PvNF-YB7	1	-----MAESDNESGG-----CKNESS-----ICREQD
PvNF-YB1	1	-----MADSDNDSGGA-----QNAGNSGSESEL-----SREQD
PvNF-YB4	1	-----MTGKRNTIISPV-----GSPTSCNISDS-----SSREQD
PvNF-YB2	1	-----MSDAPASP-----SHESGGEQSPRGSS-SGAREQD
PvNF-YB5	1	-----MSDAPASP-----SHESGGEQSPRGSS-SGAREQD
PvNF-YB14	1	-----MADGPSSPGGG-----SHESG-DHSR-----SNVREQD
NF-YBmouse	1	-----MTMDGDSSTTDASQLGISADYIGGSHYVIQPHDDTDSMMNDHEDTNGSKESREQD
PvNF-YB12	9	QYMPIANVLRIMKKILPPHAKISDEAKETVQECVSEYISFITAEANDRCQREKRKTITAE
PvNF-YB13	8	KALPIANVGRIMKKILPPSAKISKEKQLMOECVTEFISFVTGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB10	22	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFVTSEASEKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB11	43	CTIPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFVTSEASEKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB6	42	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFVTGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB8	61	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFVTGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB9	46	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFVTGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB3	29	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB7	23	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB1	29	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB4	31	RLPIANVGRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITGEASDKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB2	30	RYLPIANTSRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITSEASEKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB5	30	RYLPIANTSRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITSEASEKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB14	29	RYLPIANTSRIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITSEASEKCKEKRKTITVNGD
NF-YBmouse	57	INLPIANVARIMKKILPPNAKISKEAKETVQECVSEFISFITSEASEKCKEKRKTITVNGD
PvNF-YB12	69	DVLWAMGRLGFDDEYAQSLSVYLTTRYROSEGERMSVTPASTS-----APPFEMN
PvNF-YB13	68	DICWALSSLGFDNYAETIARYLHKYROAEREMNNHKKYEG-----SATQTLN
PvNF-YB10	82	DICWALSTLGFDDYAAPMER-----KSTTKIQEA-----
PvNF-YB11	103	DICWALSSLGFDDEYAETIARYLHKYREVEVDRAHQER-----GNSPSKD
PvNF-YB6	102	DICWALATLGFDDYAETIARYLHKYRELEGERANQNG-----NSYENNN
PvNF-YB8	121	DVIWALTTLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERLNPQQLRSEQRLQHQNNNSNQEDN
PvNF-YB9	106	DLIWALTTLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERLNPQRQRSEQRLHHQHQN-PHQDQNN
PvNF-YB3	89	DLLWAMTTLGFEDYVEPLKTYLQKYREMEGERTAMGRPLGGGGAGDQRDEAYGHAHG
PvNF-YB7	83	DLLWAMASLGFDYVEPLKTYLQKYREMEGERTAMIVK-----HHGAT
PvNF-YB1	89	DLLWAMTTLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERTVAARD-----KDASSAVSGY
PvNF-YB4	91	DLLWAMTTLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERSSMAKQEEHSPTDQTHQTNDSVSELNKL
PvNF-YB2	90	DLLWAMATLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERSSMAKQEEHSPTDQTHQTNDSVSELNKL
PvNF-YB5	90	DLLWAMATLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERSSMAKQEEHSPTDQTHQTNDSVSELNKL
PvNF-YB14	89	DLLWAMATLGFEDYVEPLKTYLQKYREIEGERSSMAKQEEHSPTDQTHQTNDSVSELNKL
NF-YBmouse	117	DILFAMSTLGFDSYVEPLKTYLQKYREIEGERSSMAKQEEHSPTDQTHQTNDSVSELNKL
PvNF-YB12	117	PPYPPYPHGFGMFDYDPSQSIAS-----SSRAAGGFVFNDFPYAN
PvNF-YB13	116	QPQLLILPP-----PPPSLS-----RVTG-----KVQN
PvNF-YB10		
PvNF-YB11	148	KDNEF-----
PvNF-YB6	147	IANIY-----
PvNF-YB8	181	NQQQFNAAASTNLISQPPYVAT-----DQKFSLPSPNSIQN--
PvNF-YB9	165	NNNLSVVSSYSSPTLLSQPSYVPT-----DQLFSLPSPNSLQKQL
PvNF-YB3	149	GMVPSNMMVMGHHQGHVYSGS-----AGSASS-----
PvNF-YB7	126	GLYANPL-----
PvNF-YB1	138	DYSPSSAASMMHHQGHVYSGSPA-----FHQVSAGPVMGKPGPG
PvNF-YB4	151	PHSVTTKADFNFTSGGFYSVSGSRVTPAKTFTDGGINGYRDSMNSIIAQSAVSGQDQAS
PvNF-YB2	137	VGLAGQNSQLVHQGSLNYISLQ-----VQPQHMLVPSMQSHE--
PvNF-YB5	137	VGIAGQNSQLVHQGSLNYISLQ-----VQPQHMLVPSMQSHE--
PvNF-YB14	136	Q--PNFNAQLAQCSFSQGVSY-----TNSQVTILSLFDVLSSF
NF-YBmouse	162	SEELTEEAFTNQLPAGLITADG-----QQQNMVYTTYSQQISG
PvNF-YB12	157	PKPTGNGM-----
PvNF-YB13	138	PPTTDQSG-----
PvNF-YB10		
PvNF-YB11		
PvNF-YB6		
PvNF-YB8	219	---HHIDSVGHWYE-
PvNF-YB9	205	QPQDQIDSVGQW---
PvNF-YB3	177	-----ARTR---
PvNF-YB7		
PvNF-YB1	176	PGPSYPAPGRPR---
PvNF-YB4	211	GNRLMPPNLRVYRVEW
PvNF-YB2		
PvNF-YB5		
PvNF-YB14	173	FLFFWAVNVEC----
NF-YBmouse	201	VQIQIFS-----

Figura S2. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas completas de la familia PvNF-YB.

Alineamiento múltiple de las proteínas completas NF-YB de *P. vulgaris* y ratón. El análisis se realizó utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Los residuos negros representan aminoácidos idénticos, mientras que los grises indican sustituciones conservativas.

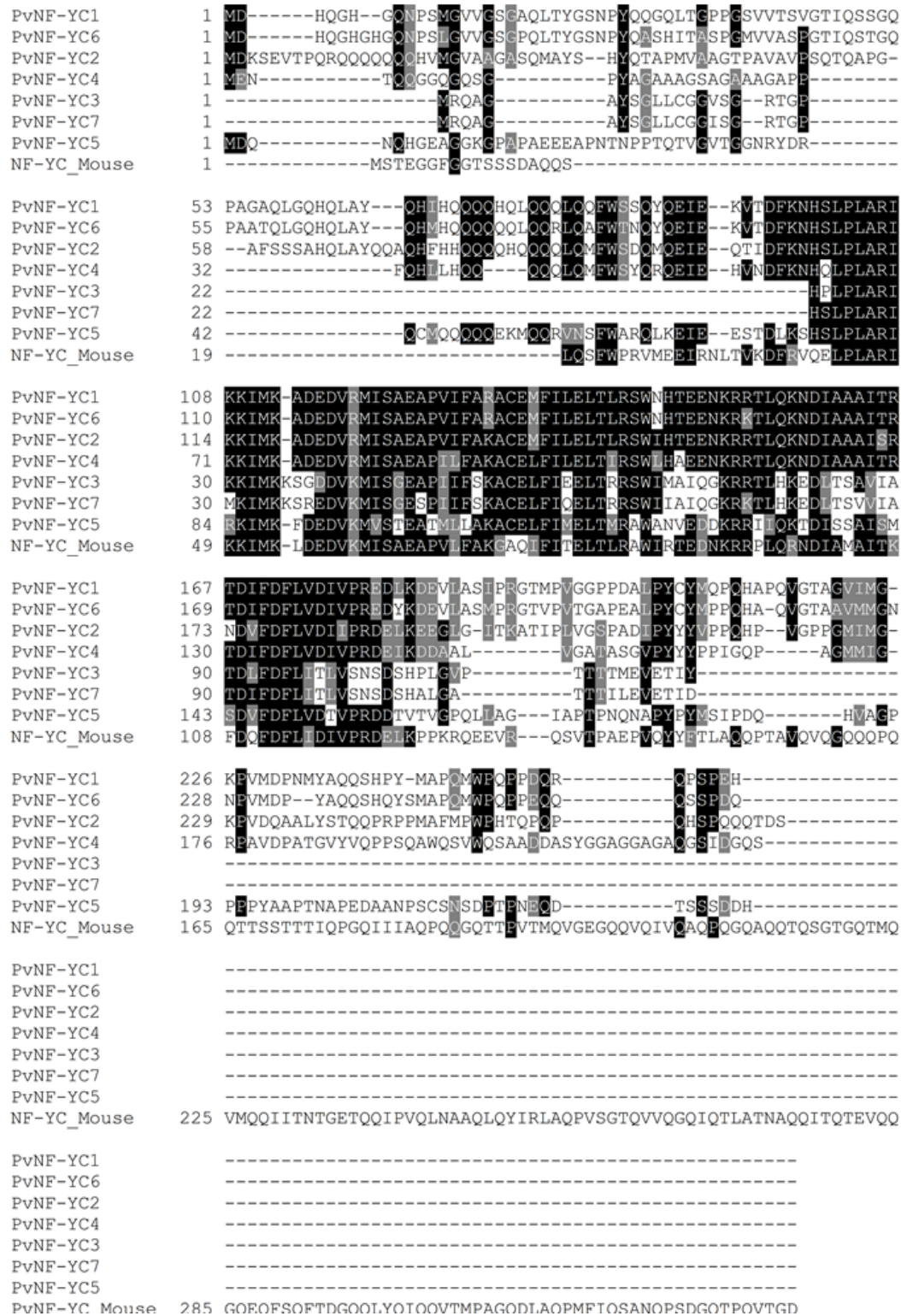


Figure S3. Alineamiento múltiple de las secuencias proteicas completas de la familia PvNF-YC.

Alineamiento múltiple de las proteínas completas NF-YC de *P. vulgaris* y ratón. El análisis se realizó utilizando el programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Los residuos negros representan aminoácidos idénticos, mientras que los grises indican sustituciones conservativas.

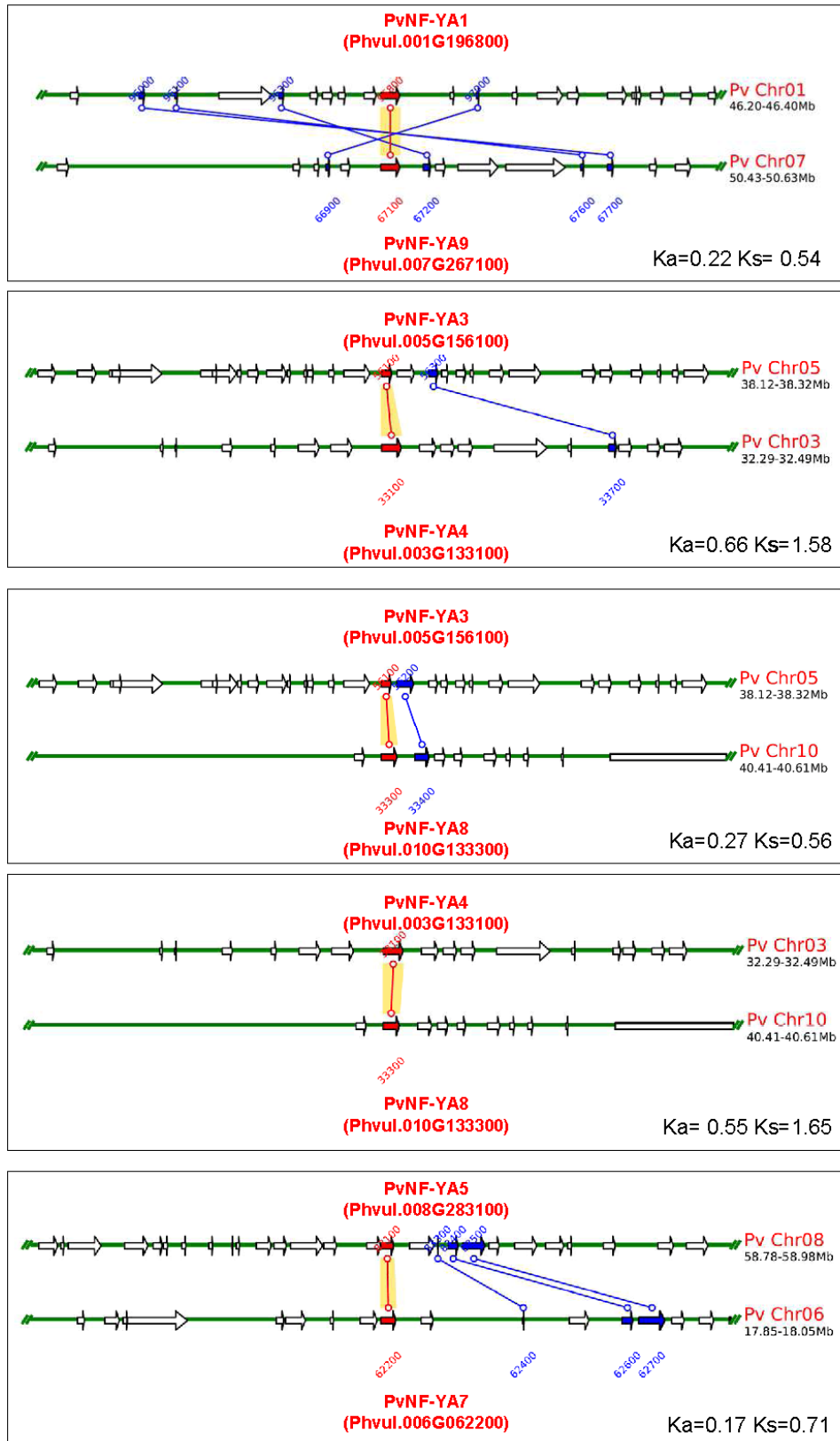


Figura S4. Análisis de microsinetia para loci PvNF-YA en *P. vulgaris*.

Los bloques colineales conteniendo los loci PvNF-YA se obtuvieron utilizando la función Locus Search disponible en el sitio PGDD. Se muestran las estructuras de bloques colineales de ± 100 kb. En cada caso, los loci PvNF-YA se indican mediante flechas rojas. Las flechas azules corresponden a otros genes anclados en las regiones mostradas. Se indican los valores de sustituciones no sinónimas (Ka) y sinónimas (Ks).

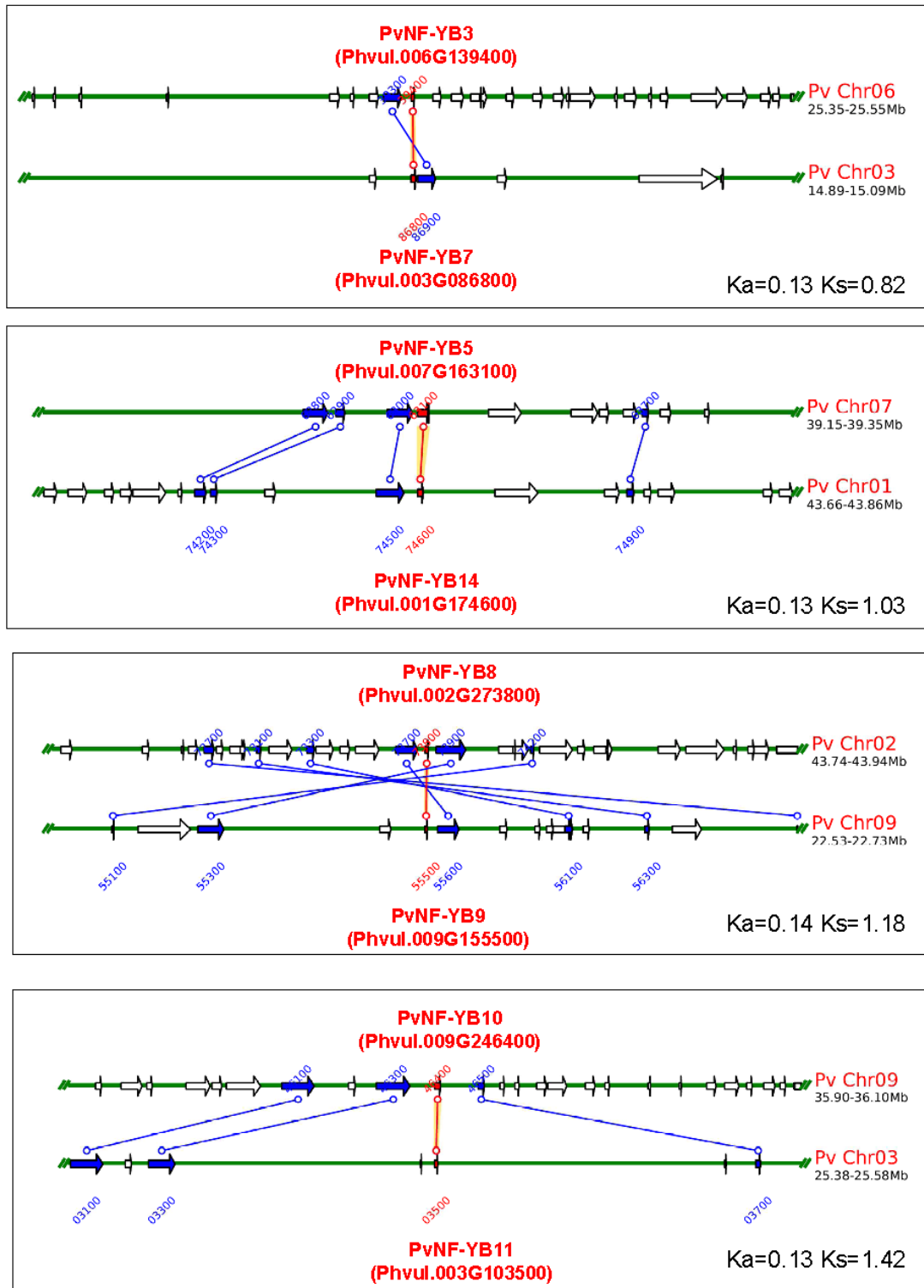


Figura S5. Análisis de microsintenia para *loci* PvNF-YB en *P. vulgaris*.

Los bloques colineales conteniendo los *loci* PvNF-YB se obtuvieron utilizando la función Locus Search disponible en el sitio PGDD. Se muestran las estructuras de bloques colineales de ± 100 kb. En cada caso, los *loci* PvNF-YB se indican mediante flechas rojas. Las flechas azules corresponden a otros genes anclados en las regiones mostradas. Se indican los valores de sustituciones no sinónimas (Ka) y sinónimas (Ks).

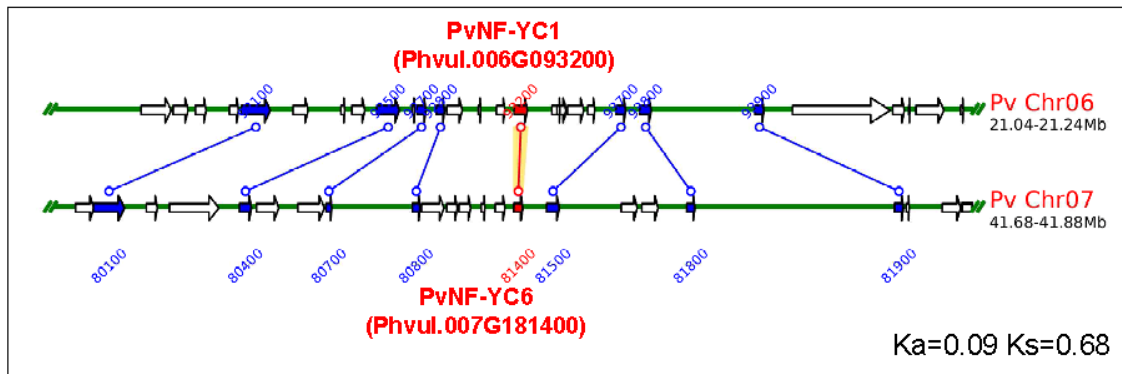


Figura S6. Análisis de microsentencia para los loci PvNF-YC1 y -C6 en *P. vulgaris*.

Los bloques colineales conteniendo los loci PvNF-YC se obtuvieron utilizando la función Locus Search disponible en el sitio PGDD. Se muestran las estructuras de bloques colineales de ± 100 kb. En cada caso, los loci PvNF-YC se indican mediante flechas rojas. Las flechas azules corresponden a otros genes anclados en las regiones mostradas. Se indican los valores de sustituciones no sinónimas (Ka) y sinónimas (Ks).

Tabla S1. Matriz de identidad de la familia NF-YA para proteínas de longitud completa.

Identidad de aminoácidos										
	PvNF-YA1	PvNF-YA9	PvNF-YA3	PvNF-YA8	PvNF-Y4	PvNF-YA5	PvNF-YA7	PvNF-YA6	Pv NF-YA2	NF-YA_Mouse
PvNF-YA1	100.00	63.23	23.91	23.38	31.22	21.60	21.59	23.85	27.18	21.95
PvNF-YA9	63.23	100.00	27.49	26.04	28.96	25.90	22.60	27.24	29.02	26.94
PvNF-YA3	23.91	27.49	100.00	61.48	39.80	22.09	19.01	25.91	34.55	24.00
PvNF-YA8	23.38	26.04	61.48	100.00	41.44	25.44	21.43	25.86	36.41	27.00
PvNF-YA4	31.22	28.96	39.80	41.44	100.00	31.25	28.38	30.69	41.42	33.12
PvNF-YA5	21.60	25.90	22.09	25.44	31.25	100.00	71.48	43.67	30.56	23.50
PvNF-YA7	21.59	22.60	19.01	21.43	28.38	71.48	100.00	43.96	30.39	21.24
PvNF-YA6	23.85	27.24	25.91	25.86	30.69	43.67	43.96	100.00	40.62	23.61
PvNF-YA2	27.18	29.02	34.55	36.41	41.42	30.56	30.39	40.62	100.00	26.15
NF-YA_Mouse	21.95	26.94	24.00	27.00	33.12	23.50	21.24	23.61	26.15	100.00

Tabla S2. Matriz de identidad de la familia NF-YB para proteínas de longitud completa

Identidad de aminoácidos															
	PvNF-YB12	PvNF-YB13	PvNF-YB10	PvNF-YB11	PvNF-YB6	PvNF-YB8	PvNF-YB9	PvNF-YB3	PvNF-YB7	PvNF-YB1	PvNF-YB4	PvNF-YB2	PvNF-YB5	PvNF-YB14	NF-Y_Mouse
NF-YB12	100.00	46.21	53.12	51.28	50.85	39.38	37.89	46.85	53.45	42.41	41.72	40.27	40.27	40.51	33.96
NF-YB13	46.21	100.00	66.67	62.39	67.52	47.86	47.89	51.15	60.00	44.29	45.45	45.04	45.04	39.57	39.72
NF-YB10	53.12	66.67	100.00	80.00	69.09	55.45	59.62	60.00	65.00	58.10	58.10	56.88	56.88	56.19	54.55
NF-YB11	51.28	62.39	80.00	100.00	58.67	46.71	49.32	53.28	59.69	49.64	48.92	51.45	51.45	48.15	40.27
NF-YB6	50.85	67.52	69.09	58.67	100.00	52.98	55.56	54.74	61.24	53.28	56.12	52.90	52.90	53.33	43.62
NF-YB8	39.38	47.86	55.45	46.71	52.98	100.00	76.78	46.67	59.09	50.00	45.73	42.77	42.77	47.19	36.14
NF-YB9	37.89	47.89	59.62	49.32	55.56	76.78	100.00	48.28	59.38	47.51	44.39	42.77	42.77	45.20	38.34
NF-YB3	46.85	51.15	60.00	53.28	54.74	46.67	48.28	100.00	79.55	69.82	55.00	51.88	51.88	54.60	44.10
NF-YB7	53.45	60.00	65.00	59.69	61.24	59.09	59.38	79.55	100.00	67.42	63.64	60.77	60.77	63.57	47.73
NF-YB1	42.41	44.29	58.10	49.64	53.28	50.00	47.51	69.82	67.42	100.00	54.01	53.57	53.57	54.14	42.70
NF-YB4	41.72	45.45	58.10	48.92	56.12	45.73	44.39	55.00	63.64	54.01	100.00	46.15	46.15	48.35	43.65
NF-YB2	40.27	45.04	56.88	51.45	52.90	42.77	42.77	51.88	60.77	53.57	46.15	100.00	100.00	70.66	45.03
NF-YB5	40.27	45.04	56.88	51.45	52.90	42.77	42.77	51.88	60.77	53.57	46.15	100.00	100.00	70.66	45.03
NF-YB14	40.51	39.57	56.19	48.15	53.33	47.19	45.20	54.60	63.57	54.14	48.35	70.66	70.66	100.00	44.63
NF-YBMouse	33.96	39.72	54.55	40.27	43.62	36.14	38.34	44.10	47.73	42.70	43.65	45.03	45.03	44.63	100.00

Tabla S3. Matriz de identidad de la familia NF-YC para proteínas de longitud completa

Identidad de aminoácidos								
	PvNF-YC1	PvNF-YC6	PvNF-YC2	PvNF-YC4	PvNF-YC3	PvNF-YC7	PvNF-YC5	NF-YC_Mouse
PvNF-YC1	100.00	85.60	59.13	56.73	46.28	45.00	39.56	41.54
PvNF-YC6	85.60	100.00	58.10	56.04	44.63	45.00	40.44	40.51
PvNF-YC2	59.13	58.10	100.00	57.75	44.63	42.50	37.78	42.42
PvNF-YC4	56.73	56.04	57.75	100.00	49.59	48.33	38.76	45.03
PvNF-YC3	46.28	44.63	44.63	49.59	100.00	86.78	42.98	43.81
PvNF-YC7	45.00	45.00	42.50	48.33	86.78	100.00	40.83	40.38
PvNF-YC5	39.56	40.44	37.78	38.76	42.98	40.83	100.00	36.13
NF-YC_Mouse	41.54	40.51	42.42	45.03	43.81	40.38	36.13	100.00

Tabla S4. *Primers* utilizados para RT-qPCR, PCR, clonados.

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
qPvNF-YA1 F	TCATTTTGGATCTTCTGTGCACAC
qPvNF-YA1 R	GCTTCTTCATCTGGTCTCATAAAGG
qPvNF-YA2 F	GTGTGGTAGGTACGTTAGGATG
qPvNF-YA2 R	CTTCTGACAATCTCTAATCTCTCTACAG
qPvNF-YA3 F	CATACATCTGATAAGGGTGGTGG
qPvNF-YA3 R	CCAAACAAACAGCAATAAATAGCAAC
qPvNF-YA4 F	ATTTCAGGCAGCCCGAACA
qPvNF-YA4 R	AAGGATGATTGCCAGACCAGT
qPvNF-YA5 F	GCGTCTTGCTATTGAGTAAACCAC
qPvNF-YA5R	CCATATGATGATTAGCATAAACACAGCC
qPvNF-YA6 F	GGCTTTCAAATAGCACTTCCCTC
qPvNF-YA6 R	ATAGAGTACACCATGCCACTGC
qPvNF-YA7 F	TCAGGTGAAAGAGTGGAGGAAG
qPvNF-YA7 R	CCACAAACACAAGAACAAGCCA
qPvNF-YA8 F	GGAAACCAACACCGTCTATCAG
qPvNF-YA8 R	GGATGACTTCCCCATGTAACAC
qPvNF-YA9 F	AGGTTTCGATGGCTTTTCTGT
qPvNF-YA9 R	CATCTAGTGGGCATGGTGATAC
qPvNF-YB1 F	GTTCCATCAAGTGAGTGCCG
qPvNF-YB1 R	AGGAGTGGCAAATAGAGGACC
qPvNF-YB2 F	GACATGGATGGAAAGAATGGTGTA
qPvNF-YB2 R	CCACCCCAACACACGTTTT
qPvNF-YB3 F	GTTTGTAGGTGGTGGCGTTT
qPvNF-YB3 R	CATTGCCTCCATTGCTGTTACC
qPvNF-YB4 F	ACGTTATAGGGTTGAATGGTAGAT
qPvNF-YB4 R	AAGAAAGCGTGTGAAATGTAGC
qPvNF-YB5 F	TGTACCCCTTGGCATATTGAATG
qPvNF-YB5 R	TTGATGGAATAAAACAAGGACTGATCC
qPvNF-YB6 F	TGAGAGAGCAAACCAAAATAAGGG
qPvNF-YB6 R	ACCTTGAACATCTGAAATGTGAGG
qPvNF-YB7 F	GATGGAAGGGGAGAAAAGTGC
qPvNF-YB7 R	CCCTATGTGCATCCACAATTACC
qPvNF-YB8 F	AGAGGGAGAAGAGAAAGACCATC
qPvNF-YB8 R	GTGTTGTTGTAGCCTTTGTTTCTAGA
qPvNF-YB9 F	TCGTTCTGAACAAAGGCTACAAC
qPvNF-YB9 R	CTGAATTGAGTTTGGAGAGAAGGG
qPvNF-YB10 F	GGAGAAAGACAGTGAATGGTGATG

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
qPvNF-YB10 R	GGATTTTCGTCCTTGATTTCCTTCTC
qPvNF-YB11 F	TGCAGAGCCATTGAGAAGG
qPvNF-YB11 R	ATGGTTGTTCTAGCTTGAGGG
qPvNF-YB12 F	CCTTATGCTAATCCACCAAAACCT
qPvNF-YB12 R	ACTGAAGAAAACACAACACAGGAAAG
qPvNF-YB13 F	GGACTTCCCCCTTCTACCTTCTTTA
qPvNF-YB13 R	GCCTTGCCCAGTTTTATCTTCAAC
qPvNF-YB14 F	AGGTCCAGAGTAGGTGTCAAG
qPvNF-YB14 R	ACAAGAACAAAGATCTCCTATGTCAGT
qPvNF-YC1 F	GCAGGGCTATATCGGTCTTTTC
qPvNF-YC1 R	GAGTAACATTTTGGATTCAATG
qPvNF-YC2 F	AGCATTCACCCCAAAAACAAACAG
qPvNF-YC2 R	GAGTGCAAAAATCCTCAAACAATCTG
qPvNF-YC3 F	ACGGGATAAGAAACAGTAGAGAAC
qPvNF-YC3 R	CGGTATTAGTTAGAAGGGTTATTGTG
qPvNF-YC4 F	CAGGAGTTATGAAGACGCAGAAC
qPvNF-YC4 R	CCCACAGAAGGATCAATTTTATGTTT
qPvNF-YC5 F	TCATCCAGTGTTTGCAGGCATA
qPvNF-YC5 R	AAGGGTTTGCAGCTCAGGATA
qPvNF-YC6 F	AACAATCATCTCCAGACCAGTAGC
qPvNF-YC6 R	ACTGAAATGAACAGTCCAACAAAAAGG
qPvNF-YC7 F	GCCATCCAAGGCAAAAGGAAG
qPvNF-YC7 R	GTTTCAACCTCCAAAATAGTGGTGG
qEF1 F	AACTACCACCGGCCACTTGAT
qEF1 R	AGCACCCAGGCATACTTGAAT
qERN F	CTTCTCGAATTCGGAATCTT
qERN R	TGTTGCCATTGCCATTGTT
qENOD40 F	AGTTTTGTTGGCAAGCATCC
qENOD40 R	TAAGCGCAAGCAAACCTGTTG
qRIP F	CAAGTGTTATTGGGCAGAAGAGATG
qRIP R	CCGTGAGATTGGAAGTTGGAAAC
qCDC2 F	CAGCAAAAGAATTACCGCCAGGAT
qCDC2 R	GCACGCATTCTCGCATAGTCAA
qCYCB F	TTCTTGTGAGTAACCCGTGTG
qCYCB R	CATGTCCCATTTTCTATCTGAGTTG
qSIN1 F	GACATATGGCCACTTCTTCTGCT
qSIN1 R	TTCCTGGTTTGGGTGTCTTGTAT
qPhvul.006G141700.1 F	AGAGCCATGTGTACATCTTCTGC

Nombre del primer	Secuencia (5'-3')
qPhvul.006G141700.1 R	GAAACGTTTAAGGAAAAGTTCTCG
qPhvul.008G286000.1 F	TGAGGGGGGTACAAAGAAGA
qPhvul.008G286000.1 R	TCAGGGGCCAGAAAAGA
qPhvul.007G073500.1 F	ATGGGCATGGCTGGATT
qPhvul.007G073500.1 R	AAAGAAAGGTAAAAAGTTGAGTTG
qPhvul.010G129400.1 F	TCAGCTCCCCTAATGTCACCAAC
qPhvul.010G129400.1 R	TCTGCTTCTCCACTATCTGCTTCA
qPhvul.008G165200.1 F	CCCCACGATGACTTCCACCACCTC
qPhvul.008G165200.1 R	GTCGGCGGCGGCTGTTTCTTCC
PvNF-YA1 RNAi F	CTGTGACAAGTTTCGTTCTGTAG
PvNF-YA1 RNAi R	AACTGAATTGCTTCTGCGTC
PvNF-YA1 OE F	ATGCAAACTGTTTATCTTAAAGAAC
PvNF-YA1 OE R	TCAAACCTTAAGGTTGCAGCAG
HF-PvNF-YA1 OE F	CACCATGGGACATCACCATCATCACC
M13 (-20) F	GTAAAACGACGGCCAG
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC
nodC F	TGCTTGACACAACCAGCACTG
nodC R	GACAGCCAGTCGCTATTGGTCA
SIN1 RNAi F	CACCGGTCTTGTGGAGTTCCGTTT
SIN1 RNAi R	TGGATTCAAACATGGCAGTG
SIN1 ORF F	CACCCAAACGTCTCAGAAACACCCAAGTTC
SIN1 ORF stop R	CCTCCAAGCAGAAGAAGTGGCC
SIN1 ORF no stop R	TCACCTCCAAGCAGAAGAAGTGG
promPvNF-YA1 F	CACCGTGGTCCTT TCCTGTACTTGTTTCTG
promPvNF-YA1 R	CCA TTAGATGATGAGAGGGGTCGGTA
PvNF-YB7 ORF F	CACCATGGCT GAATCTGATAACGAGTCA
PvNF-YB7 ORF R	TCACAGTGGATTTGCATAAAGGC

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, O.M., Riva, O., and Peltzer, E.** (2004). Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13548-13553.
- Aguilar, O.M., Lopez, M.V., Riccillo, P.M., Gonzalez, R.A., Pagano, M., Grasso, D.H., Puhler, A., and Favelukes, G.** (1998). Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the Southern Andes in Argentina. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3520-3524.
- Albani, D., and Robert, L.S.** (1995). Cloning and characterization of a *Brassica napus* gene encoding a homologue of the B subunit of a heteromeric CCAAT-binding factor. *Gene* **167**, 209-213.
- Allan Downie, J.** (1994). Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends in Microbiology* **2**, 318-324.
- Andriankaja, A., Boisson-Dernier, A., Frances, L., Sauviac, L., Jauneau, A., Barker, D.G., and de Carvalho-Niebel, F.** (2007). AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* **19**, 2866-2885.
- Ané, J.-M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetsa, R.V., Oldroyd, G.E.D., Ajax, C., Lévy, J., Debellé, F., Baek, J.-M., Kalo, P., Rosenberg, C., Roe, B.A., Long, S.R., Dénarié, J., and Cook, D.R.** (2004). *Medicago truncatula* DMI1 Required for Bacterial and Fungal Symbioses in Legumes. *Science* **303**, 1364-1367.
- Arrighi, J.F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L.C., Mirabella, R., de Carvalho-Niebel, F., Journet, E.P., Gherardi, M., Huguet, T., Geurts, R., Denarie, J., Rouge, P., and Gough, C.** (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* **142**, 265-279.
- Ballif, J., Endo, S., Kotani, M., MacAdam, J., and Wu, Y.** (2011). Over-expression of HAP3b enhances primary root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **49**, 579-583.
- Battaglia, M., Rípodas, C., Clúa, J., Baudin, M., Aguilar, O.M., Niebel, A., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2014). A Nuclear Factor Y Interacting Protein of the GRAS Family Is Required for Nodule Organogenesis, Infection Thread Progression, and Lateral Root Growth. *Plant Physiology* **164**, 1430-1442.
- Baudin, M., Laloum, T., Lepage, A., Rípodas, C., Ariel, F., Frances, L., Crespi, M., Gamas, P.C., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A.** (2015). A phylogenetically conserved group of NF-Y transcription factors interact to control nodulation in legumes. *Plant Physiology* doi: **10.1104/pp.15.01144**.
- Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A., and Lifschitz, E.** (2006). The CCAAT binding factor can mediate interactions between CONSTANS-like proteins and DNA. *Plant J* **46**, 462-476.
- Bitocchi, E., Nanni, L., Bellucci, E., Rossi, M., Giardini, A., Zeuli, P.S., Logozzo, G., Stougaard, J., McClean, P., Attene, G., and Papa, R.** (2012). Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E788–E796.
- Blanco, F.A., Meschini, E.P., Zanetti, M.E., and Aguilar, O.M.** (2009). A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-*Rhizobium* symbiotic association. *Plant Cell* **21**, 2797-2810.
- Bolle, C.** (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**, 683-692.
- Bond, J.E., and Gresshoff, P.M.** (1993). Soybean transformation to study molecular physiology. In *Plant Responses to the Environment*. P.M. Gresshoff, ed (London: CRC Press), , 25-44.

- Broghammer, A., Krusell, L., Blaise, M., Sauer, J., Sullivan, J.T., Maolanon, N., Vinther, M., Lorentzen, A., Madsen, E.B., Jensen, K.J., Roepstorff, P., Thirup, S., Ronson, C.W., Thygesen, M.B., and Stougaard, J. (2012). Legume receptors perceive the rhizobial lipochitin oligosaccharide signal molecules by direct binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 13859-13864.
- Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., and Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* **252**, 55-128.
- Calvenzani, V., Testoni, B., Gusmaroli, G., Lorenzo, M., Gnesutta, N., Petroni, K., Mantovani, R., and Tonelli, C. (2012). Interactions and CCAAT-binding of *Arabidopsis thaliana* NF-Y subunits. *PLoS One* **7**, e42902.
- Cao, S., Kumimoto, R.W., Siriwardana, C.L., Risinger, J.R., and Holt, B.F., 3rd. (2011). Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in the monocot model plant *Brachypodium distachyon*. *PLoS One* **6**, e21805.
- Caretti, G., Salsi, V., Vecchi, C., Imbriano, C., and Mantovani, R. (2003). Dynamic recruitment of NF-Y and histone acetyltransferases on cell-cycle promoters. *J Biol Chem* **278**, 30435-30440.
- Catoira, R. (2000). Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**, 1647-1665.
- Ceribelli, M., Dolfini, D., Merico, D., Gatta, R., Vigano, A.M., Pavesi, G., and Mantovani, R. (2008). The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. *Mol Cell Biol* **28**, 2047-2058.
- Cerri, M.R., Frances, L., Laloum, T., Auriac, M.-C., Niebel, A., Oldroyd, G.E.D., Barker, D.G., Fournier, J., and de Carvalho-Niebel, F. (2012). *Medicago truncatula* ERN Transcription Factors: Regulatory Interplay with NSP1/NSP2 GRAS Factors and Expression Dynamics throughout Rhizobial Infection. *Plant Physiology* **160**, 2155-2172.
- Combier, J.P., de Billy, F., Gamas, P., Niebel, A., and Rivas, S. (2008). Trans-regulation of the expression of the transcription factor MtHAP2-1 by a uORF controls root nodule development. *Genes Dev* **22**, 1549-1559.
- Combier, J.P., Frugier, F., de Billy, F., Boualem, A., El-Yahyaoui, F., Moreau, S., Vernie, T., Ott, T., Gamas, P., Crespi, M., and Niebel, A. (2006). MtHAP2-1 is a key transcriptional regulator of symbiotic nodule development regulated by microRNA169 in *Medicago truncatula*. *Genes Dev* **20**, 3084-3088.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., and VandenBosch, K. (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell* **7**, 43-55.
- Coustry, F., Maity, S.N., Sinha, S., and de Crombrughe, B. (1996). The transcriptional activity of the CCAAT-binding factor CBF is mediated by two distinct activation domains, one in the CBF-B subunit and the other in the CBF-C subunit. *J Biol Chem* **271**, 14485-14491.
- Crespi, M.D., Jurkevitch, E., Poiret, M., d'Aubenton-Carafa, Y., Petrovics, G., Kondorosi, E., and Kondorosi, A. (1994). *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J* **13**, 5099-5112.
- Cui, H., Levesque, M.P., Vernoux, T., Jung, J.W., Paquette, A.J., Gallagher, K.L., Wang, J.Y., Blilou, I., Scheres, B., and Benfey, P.N. (2007). An Evolutionarily Conserved Mechanism Delimiting SHR Movement Defines a Single Layer of Endodermis in Plants. *Science* **316**, 421-425.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* **133**, 462-469.
- Dalla Via, V., Narduzzi, C., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A. (2015). Changes in the Common Bean Transcriptome in Response to Secreted and Surface Signal Molecules of *Rhizobium etli*. *Plant Physiology* **169**, 1356-1370.

- de Silvio, A., Imbriano, C., and Mantovani, R.** (1999). Dissection of the NF-Y transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res* **27**, 2578-2584.
- Dixon, R., and Kahn, D.** (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Micro* **2**, 621-631.
- Dolfini, D., Gatta, R., and Mantovani, R.** (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **47**, 29-49.
- Ehrhardt, D.W., Wais, R., and Long, S.R.** (1996). Calcium spiking in plant root hairs responding to Rhizobium nodulation signals. *Cell* **85**, 673-681.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., and Kiss, G.B.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962-966.
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Diaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillen, G., Sanchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P.M., and Sanchez, F.** (2006). Agrobacterium rhizogenes transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1385-1393.
- Fang, Y., and Hirsch, A.M.** (1998). Studying Early Nodulin Gene ENOD40 Expression and Induction by Nodulation Factor and Cytokinin in Transgenic Alfalfa. *Plant Physiology* **116**, 53-68.
- Ferguson, B.J., Ross, J.J., and Reid, J.B.** (2005). Nodulation Phenotypes of Gibberellin and Brassinosteroid Mutants of Pea. *Plant Physiology* **138**, 2396-2405.
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.-H., Lin, Y.-H., Reid, D.E., and Gresshoff, P.M.** (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 61-76.
- Filli, J.** (2002). Capítulo XI: El poroto como alimento,. In *El cultivo de poroto en la republica argentina* INTA, ed (INTA Ed).
- Gage, D.J.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 280-300.
- Gepts, P., Osborn, T.C., Rashka, K., and Bliss, F.A.** (1986). Phaseolin-protein Variability in Wild Forms and Landraces of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for Multiple Centers of Domestication. *Economic Botany* **40**, 451-468.
- Geurts, R., Fedorova, E., and Bisseling, T.** (2005). Nod factor signaling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 346-352.
- Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Munoz, A., Poovaiah, B.W., and Oldroyd, G.E.** (2006). Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **441**, 1149-1152.
- Gobbato, E., Marsh, J.F., Vernie, T., Wang, E., Maillet, F., Kim, J., Miller, J.B., Sun, J., Bano, S.A., Ratet, P., Mysore, K.S., Denarie, J., Schultze, M., and Oldroyd, G.E.** (2012). A GRAS-type transcription factor with a specific function in mycorrhizal signaling. *Curr Biol* **22**, 2236-2241.
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., and Frugier, F.** (2006). The Medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with Sinorhizobium meliloti. *Plant Cell* **18**, 2680-2693.
- Gonzalez-Rizzo, S., Laporte, P., Crespi, M., and Frugier, F.** (2009). Legume Root Architecture: A Peculiar Root System. In *Annual Plant Reviews Volume 37: Root Development* (Wiley-Blackwell), pp. 239-287.
- Graham, P.H., and Vance, C.P.** (2003). Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* **131**, 872-877.
- Gusmaroli, G., Tonelli, C., and Mantovani, R.** (2002). Regulation of novel members of the Arabidopsis thaliana CCAAT-binding nuclear factor Y subunits. *Gene* **283**, 41-48.

- Hackenberg, D., Wu, Y., Voigt, A., Adams, R., Schramm, P., and Grimm, B.** (2012). Studies on differential nuclear translocation mechanism and assembly of the three subunits of the *Arabidopsis thaliana* transcription factor NF-Y. *Mol Plant* **5**, 876-888.
- Hayashi, T., Banba, M., Shimoda, Y., Kouchi, H., Hayashi, M., and Imaizumi-Anraku, H.** (2010). A dominant function of CCaMK in intracellular accommodation of bacterial and fungal endosymbionts. *Plant J* **63**, 141-154.
- Heckmann, A.B., Lombardo, F., Miwa, H., Perry, J.A., Bunnewell, S., Parniske, M., Wang, T.L., and Downie, J.A.** (2006). *Lotus japonicus* Nodulation Requires Two GRAS Domain Regulators, One of Which Is Functionally Conserved in a Non-Legume. *Plant Physiology* **142**, 1739-1750.
- Hellens, R., Mullineaux, P., and Klee, H.** (2000). Technical Focus: A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in plant science* **5**, 446-451.
- Hirsch, A.M., and Fang, Y.** (1994). Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Molecular Biology* **26**, 5-9.
- Hirsch, A.M., Bhuvaneswari, T.V., Torrey, J.G., and Bisseling, T.** (1989). Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 1244-1248.
- Hirsch, S., Kim, J., Muñoz, A., Heckmann, A.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.D.** (2009). GRAS Proteins Form a DNA Binding Complex to Induce Gene Expression during Nodulation Signaling in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell Online* **21**, 545-557.
- Hogekamp, C., Arndt, D., Pereira, P.A., Becker, J.D., Hohnjec, N., and Kuster, H.** (2011). Laser microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread. *Plant Physiol* **157**, 2023-2043.
- Horton, P., and Nakai, K.** (1997). Better Prediction of Protein Cellular Localization Sites with the it k Nearest Neighbors Classifier. In *Proceedings of the 5th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (AAAI Press)*, pp. 147-152.
- Horvath, B., Bachem, C.W., Schell, J., and Kondorosi, A.** (1987). Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J* **6**, 841-848.
- Horváth, B., Yeun, L.H., Domonkos, Á., Halász, G., Gobbato, E., Ayaydin, F., Miró, K., Hirsch, S., Sun, J., Tadege, M., Ratet, P., Mysore, K.S., Ané, J.-M., Oldroyd, G.E.D., and Kaló, P.** (2011). *Medicago truncatula* IPD3 Is a Member of the Common Symbiotic Signaling Pathway Required for Rhizobial and Mycorrhizal Symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 1345-1358.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Molecular Cell* **9**, 789-798.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Allan Downie, J., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G.-J., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M., and Hayashi, M.** (2005). Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* **433**, 527-531.
- Indrasumunar, A., Kereszt, A., Searle, I., Miyagi, M., Li, D., Nguyen, C.D.T., Men, A., Carroll, B.J., and Gresshoff, P.M.** (2010). Inactivation of Duplicated Nod Factor Receptor 5 (NFR5) Genes in Recessive Loss-of-Function Non-Nodulation Mutants of Allotetraploid Soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant and Cell Physiology* **51**, 201-214.

- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C.** (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium–Medicago model. *Nat Rev Microbiol.* **5**, 619-633.
- Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G., and Barker, D.G.** (1994). Rhizobium meliloti Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J* **6**, 241-249.
- Juntawong, P., Girke, T., Bazin, J., and Bailey-Serres, J.** (2014). Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E203-212.
- Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D., and Albig, W.** (2005). Subunits of the Heterotrimeric Transcription Factor NF-Y Are Imported into the Nucleus by Distinct Pathways Involving Importin β and Importin 13. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 5339-5354.
- Kalo, P., Gleason, C., Edwards, A., Marsh, J., Mitra, R.M., Hirsch, S., Jakab, J., Sims, S., Long, S.R., Rogers, J., Kiss, G.B., Downie, J.A., and Oldroyd, G.E.** (2005). Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* **308**, 1786-1789.
- Kami, J., Velasquez, V.B., Debouck, D.G., and Gepts, P.** (1995). Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in Phaseolus vulgaris. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1101-1104.
- Kanamori, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E.M.H., Miwa, H., Downie, J.A., James, E.K., Felle, H.H., Haaning, L.L., Jensen, T.H., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 359-364.
- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193-195.
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszynski, A., Carlson, R.W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., Vinther, M., Andersen, S.U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K.J., Ronson, C.W., Blaise, M., Radutoiu, S., and Stougaard, J.** (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* **523**, 308-312.
- Kim, I.S., Sinha, S., de Crombrughe, B., and Maity, S.N.** (1996). Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. *Mol Cell Biol* **16**, 4003-4013.
- Kiss, E., Oláh, B., Kaló, P., Morales, M., Heckmann, A.B., Borbola, A., Lózsa, A., Kontár, K., Middleton, P., Downie, J.A., Oldroyd, G.E.D., and Endre, G.** (2009). LIN, a Novel Type of U-Box/WD40 Protein, Controls Early Infection by Rhizobia in Legumes. *Plant Physiology* **151**, 1239-1249.
- Kondorosi, E., and Kondorosi, A.** (2004). Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS letters* **567**, 152-157.
- Kumimoto, R.W., Zhang, Y., Siefers, N., and Holt, B.F., 3rd.** (2010). NF-YC3, NF-YC4 and NF-YC9 are required for CONSTANS-mediated, photoperiod-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*.
- Kumimoto, R.W., Siriwardana, C.L., Gayler, K.K., Risinger, J.R., Siefers, N., and Holt, B.F., III.** (2013). NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors Have Both Opposing and Additive Roles in ABA-Mediated Seed Germination. *PLoS One* **8**, e59481.

- Kwak, M., and Gepts, P.** (2009). Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor Appl Genet* **118**, 979-992.
- Kwong, R.W., Bui, A.Q., Lee, H., Kwong, L.W., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell* **15**, 5-18.
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., and Niebel, A.** (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends Plant Sci* **18**, 157-166.
- Laloum, T., Baudin, M., Frances, L., Lepage, A., Billault-Penneteau, B., Cerri, M.R., Ariel, F., Jardinaud, M.F., Gamas, P., de Carvalho-Niebel, F., and Niebel, A.** (2014). Two CCAAT box-binding transcription factors redundantly regulate early steps of the legume-rhizobia endosymbiosis. *Plant J.*
- Laporte, P., Lepage, A., Fournier, J., Catrice, O., Moreau, S., Jardinaud, M.F., Mun, J.H., Larrainzar, E., Cook, D.R., Gamas, P., and Niebel, A.** (2014). The CCAAT box-binding transcription factor NF-YA1 controls rhizobial infection. *J Exp Bot* **65**, 481-494.
- Lawton-Rauh, A.** (2003). Evolutionary dynamics of duplicated genes in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**, 396-409.
- Lee, M.-H., Kim, B., Song, S.-K., Heo, J.-O., Yu, N.-I., Lee, S., Kim, M., Kim, D., Sohn, S., Lim, C., Chang, K., Lee, M., and Lim, J.** (2008). Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **67**, 659-670.
- Lee, T.H., Tang, H., Wang, X., and Paterson, A.H.** (2013). PGDD: a database of gene and genome duplication in plants. *Nucleic Acids Res* **41**, D1152-1158.
- Lerouge, P.** (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781-784.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R., Chalhou, B., Kulikova, O., Duc, G., Journet, E.-P., Ané, J.-M., Lauber, E., Bisseling, T., Dénarié, J., Rosenberg, C., and Debelle, F.** (2004). A Putative Ca²⁺ and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science* **303**, 1361-1364.
- Li, Y., Tian, C.F., Chen, W.F., Wang, L., Sui, X.H., and Chen, W.X.** (2013). High-Resolution Transcriptomic Analyses of *Sinorhizobium* sp. NGR234 Bacteroids in Determinate Nodules of *Vigna unguiculata* and Indeterminate Nodules of *Leucaena leucocephala*. *PLoS One* **8**, e70531.
- Liang, M., Yin, X., Lin, Z., Zheng, Q., Liu, G., and Zhao, G.** (2014). Identification and characterization of NF-Y transcription factor families in Canola (*Brassica napus* L.). *Planta* **239**, 107-126.
- Limpens, E., and Bisseling, T.** (2003). Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 343-350.
- Liu, J.X., and Howell, S.H.** (2010). bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 782-796.
- Liu, W., Kohlen, W., Lillo, A., Op den Camp, R., Ivanov, S., Hartog, M., Limpens, E., Jamil, M., Smaczniak, C., Kaufmann, K., Yang, W.-C., Hooiveld, G.J.E.J., Charnikhova, T., Bouwmeester, H.J., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2011). Strigolactone Biosynthesis in *Medicago truncatula* and Rice Requires the Symbiotic GRAS-Type Transcription Factors NSP1 and NSP2. *The Plant Cell* **23**, 3853-3865.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K.M., West, M.A., Lo, R., Kwong, R.W., Yamagishi, K., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., and Harada, J.J.** (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**, 1195-1205.
- Lynch, M., and Conery, J.S.** (2000). The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* **290**, 1151-1155.

- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**, 637-640.
- Madsen, L.H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson C.W., James E.K., and Stougaard, J.** (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications* **1**, Article number: 10, doi:10.1038/ncomms1009
- Maere, S., De Bodt, S., Raes, J., Casneuf, T., Van Montagu, M., Kuiper, M., and Van de Peer, Y.** (2005). Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5454-5459.
- Magee, P.N., and Barnes, J.M.** (1956). The Production of Malignant Primary Hepatic Tumours in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer* **10**, 114-122.
- Mantovani, R.** (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* **239**, 15-27.
- Mantovani, R., Li, X.Y., Pessara, U., Hooft van Huisjdijnen, R., Benoist, C., and Mathis, D.** (1994). Dominant negative analogs of NF-YA. *J Biol Chem* **269**, 20340-20346.
- Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., and Oldroyd, G.E.** (2007). *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant Physiol* **144**, 324-335.
- Masiero, S., Imbriano, C., Ravasio, F., Favaro, R., Pelucchi, N., Gorla, M.S., Mantovani, R., Colombo, L., and Kater, M.M.** (2002). Ternary Complex Formation between MADS-box Transcription Factors and the Histone Fold Protein NF-YB. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 26429-26435.
- Mathesius, U., Charon, C., Rolfe, B.G., Kondorosi, A., and Crespi, M.** (2000). Temporal and Spatial Order of Events During the Induction of Cortical Cell Divisions in White Clover by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Inoculation or Localized Cytokinin Addition. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 617-628.
- Mazziotta, L., Reynoso, M.A., Aguilar, O.M., Blanco, F.A., and Zanetti, M.E.** (2012). Transcriptional and functional variation of NF-YC1 in genetically diverse accessions of *Phaseolus vulgaris* during the symbiotic association with *Rhizobium etli*. *Plant Biology*, DOI: 10.1111/j.1438-8677.2012.00683.x.
- Mbengue, M., Camut, S., de Carvalho-Niebel, F., Deslandes, L., Froidure, S., Klaus-Heisen, D., Moreau, S., Rivas, S., Timmers, T., Hervé, C., Cullimore, J., and Lefebvre, B.** (2010). The *Medicago truncatula* E3 Ubiquitin Ligase PUB1 Interacts with the LYK3 Symbiotic Receptor and Negatively Regulates Infection and Nodulation. *The Plant Cell* **22**, 3474-3488.
- McNabb, D.S., Tseng, K.A., and Guarente, L.** (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol Cell Biol* **17**, 7008-7018.
- Messinese, E., Mun, J.-H., Yeun, L.H., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lounnon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D.R., and Ané, J.-M.** (2007). A Novel Nuclear Protein Interacts With the Symbiotic DMI3 Calcium- and Calmodulin-Dependent Protein Kinase of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 912-921.
- Middleton, P.H., Jakab, J., Penmetsa, R.V., Starker, C.G., Doll, J., Kalo, P., Prabhu, R., Marsh, J.F., Mitra, R.M., Kereszt, A., Dudas, B., VandenBosch, K., Long, S.R., Cook, D.R., Kiss, G.B., and Oldroyd, G.E.** (2007). An ERF transcription

- factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* **19**, 1221-1234.
- Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E., and Long, S.R.** (2004). A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4701-4705.
- Miwa, H., Sun, J., Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2006). Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 914-923.
- Miyoshi, K., Ito, Y., Serizawa, A., and Kurata, N.** (2003). OsHAP3 genes regulate chloroplast biogenesis in rice. *Plant J* **36**, 532-540.
- Moreau, S., Verdenaud, M., Ott, T., Letort, S., de Billy, F., Niebel, A., Gouzy, J., de Carvalho-Niebel, F., and Gamas, P.** (2011). Transcription Reprogramming during Root Nodule Development in *Medicago truncatula*. *PLoS One* **6**, e16463.
- Morris, D.R., and Geballe, A.P.** (2000). Upstream Open Reading Frames as Regulators of mRNA Translation. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 8635-8642.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J., and Imbert, A.** (2006). LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* **16**, 801-809.
- Murray, J.D., Karas, B.J., Sato, S., Tabata, S., Amyot, L., and Szczygłowski, K.** (2007). A cytokinin perception mutant colonized by *Rhizobium* in the absence of nodule organogenesis. *Science* **315**, 101-104.
- Mustroph, A., Zanetti, M.E., Jang, C.J., Holtan, H.E., Repetti, P.P., Galbraith, D.W., Girke, T., and Bailey-Serres, J.** (2009). Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18843-18848.
- Mylona, P., Pawlowski, K., and Bisseling, T.** (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell Online* **7**, 869-885.
- Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K.-i., Haga, T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., and Kawaguchi, M.** (2005). *klavier* (*klv*), A novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *The Plant Journal* **44**, 505-515.
- Oldroyd, G.E.** (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**, 252-263.
- Oldroyd, G.E., and Long, S.R.** (2003). Identification and characterization of nodulation-signaling pathway 2, a gene of *Medicago truncatula* involved in Nod actor signaling. *Plant Physiol* **131**, 1027-1032.
- Oldroyd, G.E., and Downie, J.A.** (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519-546.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A.** (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**, 119-144.
- Peltzer Meschini, E.P., Blanco, F.A., Zanetti, M.E., Beker, M.P., Kuster, H., Puhler, A., and Aguilar, O.M.** (2008). Host genes involved in nodulation preference in common bean (*Phaseolus vulgaris*)-*rhizobium etli* symbiosis revealed by suppressive subtractive hybridization. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 459-468.
- Petroni, K., Kumimoto, R.W., Gnesutta, N., Calvenzani, V., Fornari, M., Tonelli, C., Holt, B.F., 3rd, and Mantovani, R.** (2012). The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors. *Plant Cell* **24**, 4777-4792.
- Phillips, D.A., and Streit, W.R.** (1996). Legume signals to rhizobial symbionts: a new approach for defining rhizosphere colonization. In *Plant Microbe Interactions*. , G. Stacey and N.T. Keen, eds (Chapman and Hall, New York), pp. 236-271.
- Pysh, L.D., Wysocka-Diller, J.W., Camilleri, C., Bouchez, D., and Benfey, P.N.** (1999). The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and

- basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *The Plant Journal* **18**, 111-119.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E.M., Albrechtsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., and Stougaard, J.** (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO Journal* **26**, 3923-3935.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**, 585-592.
- Reinhardt, A., and Hubbard, T.** (1998). Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Research* **26**, 2230-2236.
- Ried, M.K., Antolín-Llovera, M., and Parniske, M.** (2014). Spontaneous symbiotic reprogramming of plant roots triggered by receptor-like kinases. *eLife* **3**.
- Ripodas, C., Via, V.D., Aguilar, O.M., Zanetti, M.E., and Blanco, F.A.** (2013). Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* **68**, 81-89.
- Robertson, G.P., and Vitousek, P.M.** (2009). Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annual Review of Environment and Resources* **34**, 97-125.
- Rolfe, B.G., and Gresshoff, P.M.** (1988). Genetic Analysis of Legume Nodule Initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**, 297-319.
- Romier, C., Cocchiarella, F., Mantovani, R., and Moras, D.** (2003). The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y. *J Biol Chem* **278**, 1336-1345.
- Rossi, M., Bitocchi, E., Bellucci, E., Nanni, L., Rau, D., Attene, G., and Papa, R.** (2009). Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L. *Evolutionary Applications* **2**, 504-522.
- Roth, L.E., and Jeon, K.** (1988). Homology in endosymbiotic systems: the term symbiosome. In *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, A.P. St. Paul, ed (APS Press, St. Paul, MN).
- Roth, L.E., and Stacey, G.** (1989). Bacterium release into host cells of nitrogen-fixing soybean nodules: the symbiosome membrane comes from three sources. *Eur J Cell Biol* **49**, 13-23.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M.-F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debellé, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C., and Gamas, P.** (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal* **77**, 817-837.
- Saito, K., Yoshikawa, M., Yano, K., Miwa, H., Uchida, H., Asamizu, E., Sato, S., Tabata, S., Imaizumi-Anraku, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murooka, Y., Szczyglowski, K., Downie, J.A., Parniske, M., Hayashi, M., and Kawaguchi, M.** (2007). NUCLEOPORIN85 Is Required for Calcium Spiking, Fungal and Bacterial Symbioses, and Seed Production in *Lotus japonicus*. *The Plant Cell Online* **19**, 610-624.
- Sambrook, J., Russel, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbour).
- Savouré, A., Magyar, M., Pierre, M., Brown, S., Schultze, M., Dudits, D., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (1994). Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. *EMBO Journal* **13**, 1093-1102.
- Schaarschmidt, S., Gresshoff, P.M., and Hause, B.** (2013). Analyzing the soybean transcriptome during autoregulation of mycorrhization identifies the transcription

- factors GmNF-YA1a/b as positive regulators of arbuscular mycorrhization. *Genome Biol* **14**, R62.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., and Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191-195.
- Scheres, B., Van De Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H., Van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A.M., Gloudemans, T., Van Kammen, A., and et al.** (1990). The ENOD12 gene product is involved in the infection process during the pea-Rhizobium interaction. *Cell* **60**, 281-294.
- Schmutz, J., McClean, P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., Song, Q., Chavarro, C., Torres-Torres, M., Geffroy, V., Moghaddam, S.M., Gao, D., Abernathy, B., Barry, K., Blair, M., Brick, M.A., Chovatia, M., Gepts, P., Goodstein, D.M., Gonzales, M., Hellsten, U., Hyten, D.L., Jia, G., Kelly, J.D., Kudrna, D., Lee, R., Richard, M.M., Miklas, P.N., Osorno, J.M., Rodrigues, J., Thareau, V., Urrea, C.A., Wang, M., Yu, Y., Zhang, M., Wing, R.A., Cregan, P.B., Rokhsar, D.S., and Jackson, S.A.** (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat Genet* **46**, 707-713.
- Siefers, N., Dang, K.K., Kumimoto, R.W., Bynum, W.E.t., Tayrose, G., and Holt, B.F., 3rd.** (2009). Tissue-specific expression patterns of Arabidopsis NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity. *Plant Physiol* **149**, 625-641.
- Simms, E.L., and Taylor, D.L.** (2002). Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integrative and Comparative Biology* **42**, 369-380.
- Singh, S., Gepts, P., and Debouck, D.** (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany* **45**, 379-396.
- Singh, S., Katzer, K., Lambert, J., Cerri, M., and Parniske, M.** (2014). CYCLOPS, A DNA-Binding Transcriptional Activator, Orchestrates Symbiotic Root Nodule Development. *Cell Host & Microbe* **15**, 139-152.
- Sinha, S., Kim, I.S., Sohn, K.Y., de Crombrughe, B., and Maity, S.N.** (1996). Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex. *Mol Cell Biol* **16**, 328-337.
- Siriwardana, C.L., Kumimoto, R.W., Jones, D.S., and Holt, B.F.** (2014). Gene Family Analysis of the Arabidopsis NF-YA Transcription Factors Reveals Opposing Absciscic Acid Responses During Seed Germination. *Plant Molecular Biology Reporter / Ispmb* **32**, 971-986.
- Smil, V.** (1999). Nitrogen in crop production: An account of global flows. *Global Biogeochem. Cycles* **13**, 647-662.
- Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debelle, F., Gough, C., Bisseling, T., and Geurts, R.** (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* **308**, 1789-1791.
- Soyano, T., and Hayashi, M.** (2014). Transcriptional networks leading to symbiotic nodule organogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* **20**, 146-154.
- Soyano, T., Kouchi, H., Hirota, A., and Hayashi, M.** (2013). Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in *Lotus japonicus*. *PLoS Genet* **9**, e1003352.
- Spaink, H.P.** (2000). ROOT NODULATION AND INFECTION FACTORS PRODUCED BY RHIZOBIAL BACTERIA. *Annual Review of Microbiology* **54**, 257-288.
- Stephenson, T.J., McIntyre, C.L., Collet, C., and Xue, G.P.** (2007). Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family of transcription factors in *Triticum aestivum*. *Plant Mol Biol* **65**, 77-92.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., and Parniske, M.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**, 959-962.

- Sun, X., Jones, W.T., and Rikkerink, E.H.A.** (2012). GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochemical Journal* **442**, 1-12.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., and McInnes, R.R.** (1993). E.coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research* **21**, 1677-1678.
- Thirumurugan, T., Ito, Y., Kubo, T., Serizawa, A., and Kurata, N.** (2008). Identification, characterization and interaction of HAP family genes in rice. *Mol Genet Genomics* **279**, 279-289.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tian, C., Wan, P., Sun, S., Li, J., and Chen, M.** (2004). Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **54**, 519-532.
- Tirichine, L., James, E.K., Sandal, N., and Stougaard, J.** (2006a). Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 373-382.
- Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Albrechtsen, A.S., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., and Stougaard, J.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science* **315**, 104-107.
- Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrechtsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S., and Stougaard, J.** (2006b). Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **441**, 1153-1156.
- Tohme, M.J., González, D. O., Beebe, S. and Duque, M. C.** (1996). AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sc.* **36**, 1375-1384.
- Torres-Galea, P., Huang, L.-F., Chua, N.-H., and Bolle, C.** (2006). The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses. *Molecular Genetics and Genomics* **276**, 13-30.
- van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaik, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J., and Kijne, J.W.** (1992). Induction of Pre-Infection Thread Structures in the Leguminous Host Plant by Mitogenic Lipo-Oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**, 70-72.
- Velasquez, V.L., and Gepts, P.** (1994). RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin. *Genome* **37**, 256-263.
- Vitousek, P., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C., Grimm, N., Howarth, R., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E., and Sprent, J.** (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* **57-58**, 1-45.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**, 949-956.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F.B., Jiang, Q., Gresshoff, P.M., De Bruijn, F.J., Stougaard, J., and Szczyglowski, K.** (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *The Plant Journal* **23**, 97-114.

- Xiao, T.T., Schilderink, S., Moling, S., Deinum, E.E., Kondorosi, E., Franssen, H., Kulikova, O., Niebel, A., and Bisseling, T.** (2014). Fate map of *Medicago truncatula* root nodules. *Development* **141**, 3517-3528.
- Xing, Y., Fikes, J.D., and Guarente, L.** (1993). Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box binding domain. *EMBO J* **12**, 4647-4655.
- Xing, Y., Zhang, S., Olesen, J.T., Rich, A., and Guarente, L.** (1994). Subunit interaction in the CCAAT-binding heteromeric complex is mediated by a very short alpha-helix in HAP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3009-3013.
- Yang, J., Xie, Z., and Glover, B.J.** (2005). Asymmetric evolution of duplicate genes encoding the CCAAT-binding factor NF-Y in plant genomes. *New Phytol* **165**, 623-631.
- Yang, W.C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H., and Bisseling, T.** (1994). Rhizobium nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *The Plant Cell* **6**, 1415-1426.
- Yano, K., Yoshida, S., Müller, J., Singh, S., Banba, M., Vickers, K., Markmann, K., White, C., Schuller, B., Sato, S., Asamizu, E., Tabata, S., Murooka, Y., Perry, J., Wang, T.L., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Hayashi, M., and Parniske, M.** (2008). CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20540-20545.
- Zanetti, M.E., Blanco, F.A., Beker, M.P., Battaglia, M., and Aguilar, O.M.** (2010). A C subunit of the plant nuclear factor NF-Y required for rhizobial infection and nodule development affects partner selection in the common bean-Rhizobium etli symbiosis. *Plant Cell* **22**, 4142-4157.
- Zhang, P., Gu, Z., and Li, W.-H.** (2003). Different evolutionary patterns between young duplicate genes in the human genome. *Genome Biology* **4**, R56.
- Zhao, M., Ding, H., Zhu, J.-K., Zhang, F., and Li, W.-X.** (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in Arabidopsis. *New Phytologist* **190**, 906-915.
- Zumft, W.G., and Mortenson, L.E.** (1975). The nitrogen-fixing complex of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **416**, 1-52.